

**ZELLDIFFERENZIERUNG UND MUKOZILIÄRER
TRANSPORT DER MAUS BEI GENDEFIZIENZ
DER MUSKARINISCHEN REZEPTOREN
M1, M2 UND M3**

MAIKE KLEIN



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und –Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. M. Bergmann

und

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. W. Kummer

**ZELLDIFFERENZIERUNG UND MUKOZILIÄRER TRANSPORT
DER MAUS BEI GENDEFIZIENZ DER MUSKARINISCHEN
REZEPTOREN M1, M2 UND M3**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

MAIKE KLEIN

Tierärztin aus Usingen

Gießen 2008

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:
Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:
Prof. Dr. M. Bergmann
Prof. Dr. W. Kummer

Tag der Disputation: 31.03.2008

Meinen Eltern Maria und Gunter

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Trachea	3
2.1.1 Das Trachealepithel in der Maus	3
2.1.1.1 Zelltypen im Trachealepithel	3
2.1.1.1.1 Morphologie der verschiedenen Zelltypen	3
2.1.1.1.2 Häufigkeit und Verteilung der verschiedenen Zelltypen	6
2.1.1.2 Zell-Zellkontakte im Trachealepithel	9
2.1.1.2.1 Zonula occludens	9
2.1.1.2.2 Zonula adhaerens	9
2.1.1.2.3 Desmosomen	10
2.1.1.3 Zilienmorphologie	10
2.1.1.3.1 Der Zilienquer- und Zilienlängsschnitt	10
2.1.2 Das Trachealsekret	11
2.1.3 Der Zilienschlag	12
2.1.3.1 Ablauf, Koordination und Beeinflussung	12
2.1.3.2 Pathophysiologie	14
2.1.4 Die Zilienschlagfrequenz	15
2.1.4.1 Ablauf, Regulation und Beeinflussung	15
2.1.4.2 Pathophysiologie	17
2.1.5 Mukoziliäre Clearance	18
2.1.5.1 Physiologie und Pathophysiologie	18
2.2 Muskarinische Rezeptoren in der Trachea	20
2.2.1 Einteilung MR	20
2.2.2 Aufbau und Signaltransduktion MR	21
2.2.3 Vorkommen und Wirkung MR in der Trachea	23
2.2.4 Pathophysiologie der MR	26
2.2.5 Therapeutische Beeinflussung der MR	27
2.2.6 MR Knockout-Mäuse	29
2.3 Azetylcholin-neuronal und non-neuronal	30
2.3.1 Das non-neuronale cholinerge System in der Trachea	31
2.3.2 Quellen von ACh in der Trachea	32
2.3.3 Funktionen von ACh in den Atemwegen: neuronal und non-neuronal	33

2.3.4 Pathophysiologie des non-neuronalen cholinergen Systems in den Atemwegen	35
3 Material und Methoden	36
3.1 Material	36
3.1.1 Chemikalien	36
3.1.2 Antikörper	37
3.1.3 Weitere eingesetzte Substanzen	37
3.1.4 Puffer und Lösungen	38
3.1.5 Geräte und Laborbedarf	41
3.1.5.1 Zellzählung	41
3.1.5.2 Transmissionselektronenmikroskopie	42
3.1.5.3 Immunhistochemie	42
3.1.5.4 Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit	43
3.1.5.5 Messung der Zilienschlagfrequenz	43
3.1.5.6 Qualitative Untersuchung der Zilienschlagtransportrichtung	43
3.2 Methoden	44
3.2.1 Zellzählung	44
3.2.1.1 Versuchstiere	44
3.2.1.2 Probengewinnung	44
3.2.1.3 Probenvorbereitung	45
3.2.1.4 Zellzahlauswertung	47
3.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie	47
3.2.2.1 Versuchstiere	47
3.2.2.2 Probengewinnung	47
3.2.2.3 Probenvorbereitung	47
3.2.2.4 Bildaufnahme	48
3.2.3 Immunhistochemie	49
3.2.3.1 Versuchstiere	49
3.2.3.2 Probengewinnung	49
3.2.3.3 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Zellzählung	51
3.2.4 Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit in der Trachea	51
3.2.4.1 Versuchstiere	51
3.2.4.2 Organentnahme	52
3.2.4.3 Vorbereitung zur Messung	52
3.2.4.4 Messung	53

3.2.4.5 Protokolle	53
3.2.4.6 Auswertung	55
3.2.5 Bestimmung der Zilienschlagfrequenz	58
3.2.5.1 Versuchstiere	58
3.2.5.2 Organentnahme	58
3.2.5.3 Vorbereitung zur Messung	59
3.2.5.4 Messung	59
3.2.5.5 Protokoll	59
3.2.5.6 Auswertung	60
3.2.6 Untersuchung zur Richtung des Partikeltransportes	62
3.2.6.1 Versuchstiere	62
3.2.6.2 Organentnahme	62
3.2.6.3 Vorbereitung zur Aufnahme	62
3.2.6.4 Aufnahmen	63
3.2.7 Statistik	63
4 Ergebnisse	64
4.1 Morphologische Befunde	64
4.1.1 Relative Häufigkeit zilientragender Zellen, nicht-zilientragender Zellen und Basalzellen im Trachealepithel im Vergleich muskarinischer Rezeptor Knockout-Mäuse zu ihren korrespondierenden WT-Stämmen	66
4.1.2 Relative Häufigkeit zilientragender Zellen, nicht-zilientragender Zellen und Basalzellen im Trachealepithel im Vergleich zervikaler Trachealabschnitt zu thorakalem Trachealabschnitt	66
4.1.3 Relative Häufigkeit zilientragender Zellen, nicht-zilientragender Zellen und Basalzellen im Trachealepithel im Vergleich der cartilaginären, muskulären und ligamentären Arealen zueinander	67
4.1.3.1 Zilientragende Zellen	67
4.1.3.2 Nicht-zilientragende Zellen	68
4.1.3.3 Basalzellen	68
4.1.4 Anzahl endokriner Zellen und Bürstenzellen im Trachealepithel von muskarinischen Rezeptor Knockout-Mäusen im Vergleich zum korrespondierenden WT-Stamm	70
4.1.4.1 Endokrine Zellen	70
4.1.4.2 Bürstenzellen	70

4.1.5 Anzahl Endokriner Zellen und Bürstenzellen im Trachealepithel im Vergleich zervikaler zu thorakaler Trachealabschnitt	70
4.1.5.1 Endokrine Zellen	70
4.1.5.2 Bürstenzellen	70
4.1.6 Ultrastruktur des Trachealepithels bei muskarinischen Rezeptor Knockout-Mäusen im Vergleich zu ihrem korrespondierenden WT-Stamm	74
4.1.6.1 Vorkommen der unterschiedlichen Zelltypen	74
4.1.6.2 Zilientragende Zellen	74
4.1.6.3 Sekretorische Zellen	76
4.1.6.4 Endokrine Zellen	78
4.1.6.5 Bürstenzellen	80
4.1.6.6 Basalzellen	82
4.1.6.7 Ausbildung der Zell-Zellkontakte	84
4.1.6.7.1 Zell-Zellkontakte zwischen zilientragenden Zellen	84
4.1.6.7.2 Zell-Zellkontakte zwischen nicht-zilientragenden Zellen	85
4.1.6.7.3 Zell-Zellkontakte zwischen einer zilientragenden Zelle und einer nicht-zilientragenden Zelle	86
4.1.6.8 Zilienmorphologie	88
4.1.6.8.1 Zilienquerschnitt und Zilienlängsschnitt	88
4.1.6.9 Zusammenfassung der elektronenmikroskopischen Befunde	90
4.2 Funktionelle Befunde	90
4.2.1 Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit	90
4.2.1.1 Etablierung des Messsystems	90
4.2.1.1.1 Mäuse aus konventioneller Haltung	90
4.2.1.1.2 Partikeltransportgeschwindigkeit nach Zugabe von ATP	90
4.2.1.1.3 Versuchsdauer und Versuchseinteilung	91
4.2.1.1.4 Ermittlung einer adäquaten Muskarinkonzentration zur effektiven Steigerung der Partikeltransportgeschwindigkeit	93
4.2.1.2 Versuche zur spezifischen Fragestellung	94
4.2.1.2.1 Partikeltransportgeschwindigkeit nach exogener Zugabe von Muskarin und ATP bei WT-Mäusen	94
4.2.1.2.2 Partikeltransportgeschwindigkeit nach exogener Zugabe von Muskarin und ATP bei M1KO-Mäusen	96
4.2.1.2.3 Partikeltransportgeschwindigkeit nach exogener Zugabe von Muskarin und ATP bei M2KO-Mäusen	98

4.2.1.2.4 Partikeltransportgeschwindigkeit nach exogener Zugabe von Muskarin und ATP bei M3KO-Mäusen	99
4.2.1.2.5 Partikeltransportgeschwindigkeit nach exogener Zugabe von Muskarin und ATP bei M2M3WT-Mäusen	100
4.2.1.2.6 Partikeltransportgeschwindigkeit nach exogener Zugabe von Muskarin und ATP bei M2M3KO-Mäusen	101
4.2.1.2.7 Vergleich der Partikeltransportgeschwindigkeit nach Muskarin- und ATP-Zugabe bei KO-Mäusen und ihrem korrespondierenden WT-Stamm	103
4.2.1.2.8 Partikeltransportgeschwindigkeit nach exogener Muskarin- und ATP-Zugabe bei M2M3KO-Mäusen und ihrem korrespondierenden WT-Stamm	107
4.2.1.2.9 Zugabe von Atropin vor Muskarin- und ATP-Zugabe	110
4.2.2 Zilienschlagfrequenz in der Trachea bei muskarinischen Rezeptor Knockout-Mäusen und ihrem korrespondierendem WT-Stamm	112
4.2.2.1 Startfrequenz	112
4.2.2.2 Zilienschlagfrequenz nach 15 min Versuchsdauer (Äquilibrationsphase)	112
4.2.2.3 Zilienschlagfrequenz nach exogener Muskarinzugabe	112
4.2.2.4 Zilienschlagfrequenz nach exogener ATP-Zugabe	113
4.2.3 Untersuchungen zur Richtung des Partikeltransportes	115
5 Diskussion	118
5.1 Einfluss der M1, M2 und M3 Rezeptorsubtypen auf die Morphologie des Trachealepithels	118
5.2 Verteilung zilentragender Zellen in der Trachea der Maus	120
5.3 Methode zur Messung der effektiven ziliären Transportleistung	121
5.4 Einfluss der M1, M2 und M3 Rezeptorsubtypen auf die Partikeltransportgeschwindigkeit und die Zilienschlagfrequenz im Trachealepithel	123
5.4.1 Der M3 Rezeptor	123
5.4.1.1 Einfluss auf die Partikeltransportgeschwindigkeit	123
5.4.1.2 Einfluss auf die Zilienschlagfrequenz	124
5.4.1.3 Einfluss des M2 Rezeptors auf die durch den M3 Rezeptor vermittelten Effekte	124
5.4.1.4 Zusammenfassung	125
5.4.2 Der M2 Rezeptor	126
5.4.2.1 Einfluss auf die Partikeltransportgeschwindigkeit	126

5.4.2.2 Einfluss auf die Zilienschlagfrequenz	127
5.4.2.3 Einfluss der M2 Rezeptorwirkung auf M3 Rezeptor-vermittelte Effekte	128
5.4.2.4 Zusammenfassung	128
5.4.3 Partikeltransportgeschwindigkeit in M2M3Doppelknockout-Mäusen	128
5.4.4 Der M1 Rezeptor	128
5.4.4.1 Einfluss auf die Partikeltransportgeschwindigkeit	128
5.4.4.2 Einfluss auf die Zilienschlagfrequenz	130
5.4.4.3 Einfluss verschiedener muskarinischer Rezeptorsubtypen auf Effekte des M1 Rezeptors	130
5.4.4.4 Einfluss des M1 Rezeptors auf die Koordination zwischen zilientragenden Zellen im Trachealepithel	131
5.4.4.5 Zusammenfassung	132
5.5 Muskarinische Rezeptoren:	
Target bei chronischen Atemwegserkrankungen	132
6 Zusammenfassung	136
7 Summary	138
8 Literaturverzeichnis	140
9 Erklärung	154
10 Anhang	155
10.1 Eigene Veröffentlichungen zum Thema	155
10.1.1 Originalarbeit	155
10.1.2 Abstract	155
10.2 Danksagung	155

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ACh	Azetylcholin
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
C-Terminus	Carboxy-terminales Ende
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂ x2H ₂ O	Calciumchloridx2hydrat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CFTR	cystisches-Fibrose-Transmembran -Regulatorprotein
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Cu	Kupfer
DAG	Diacylglycerin
E	Endpunkt
ER	endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes-Protein
GA	Golgi-Apparat
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
Hz	Hertz
IP ₃	Inositoltriphosphat
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KO	Knock-out
l	Liter
M	Molar
M. trachealis	Muskulus trachealis
min	Minuten
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mM	Millimolar
ms	Millisekunden
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
MBP	major basic protein
MC	mukoziliäre Clearance
MgCl ₂ x6H ₂ O	Magnesiumchloridx6hydrat
MR	muskarinische Rezeptoren
mRNA	messenger ribonucleic-acid
MW	Mittelwert
M1KO	muskarinischer Rezeptor 1 Knock-out
M1M3WT	muskarinischer Rezeptor 1 und 3 Wildtyp
M2KO	muskarinischer Rezeptor 2 Knock-out
M2/3KO	muskarinischer Rezeptor 2 und 3 Knock-out
M2WT	muskarinischer Rezeptor 2 Wildtyp
M3KO	muskarinischer Rezeptor 3 Knock-out
N-Terminus	aminoterminales Ende
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Dinatriumcarbonat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphatx2hydrat
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphatx2hydrat
NaOH	Natronlauge
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PLC	Phospholipase C
PP	Phosphatpuffer
PTG	Partikeltransportgeschwindigkeit
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Q	Quotient

Rh	Rhodium
RT-PCR	Real time Polymerasekettenreaktion
s	Sekunden
S	Startpunkt
SEM	Standardfehler
SPF	spezifiziert-pathogen-frei
Tab	Tabelle
WT	Wildtyp
ZSF	Zilienschlagfrequenz

1 Einleitung

Azetylcholin (ACh) ist ein weit verbreitetes, funktionell hoch relevantes Signalmolekül. Neben seiner Funktion als wichtigster Neurotransmitter im somatomotorischen und parasympathischen Nervensystem wird es auch von non-neuronalen Zellen verschiedenster Gewebe, so auch von den Atemwegsepithelien, synthetisiert und freigesetzt (Wessler und Kirkpatrick 2001a; Proskocil et al. 2004). Seine auto- und parakrine Wirkung vermittelt ACh über Cholinorezeptoren, welche nach zwei selektiven Agonisten in Nikotin- und Muskarinrezeptoren eingeteilt werden (Starke et al. 1996). Von den hier untersuchten muskarinischen Rezeptoren gibt es fünf Subtypen, M1 bis M5 (Caulfield und Birdsall, 1998).

Beim mukoziliären Transport, der Zilienschlagfrequenz, der Proliferation, Differenzierung und der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten wird diesem cholinergen System eine tragende Rolle zugewiesen (Shafer et al. 1999; Wessler et al. 2001b). Diese äußerst wichtigen und bedeutenden Effekte des cholinergen Systems erklären seine große klinische Bedeutung.

Während die spezifischen Wirkungen der muskarinischen Rezeptoren vor allem an Neuronen, Herzmuskelzellen, Drüsenzellen und glatten Muskelzellen bekannt und ausführlich beschrieben sind (Caulfield 1993), ist die spezifische Bedeutung der verschiedenen im respiratorischen Epithel vorkommenden muskarinischen Rezeptoren noch weitgehend unbekannt.

Die meisten Gewebe exprimieren mehr als einen Rezeptorsubtyp (Wess 2004). In den Atemwegen, wie für Maus, Ratte und den Menschen beschrieben, sind die dominanten Rezeptoren die M1, M2 und M3 Rezeptorsubtypen (Fryer und el-Fakahany 1990; Barnes 1993; Garssen et al. 1993). Daher wurde die bisher unbekannte spezifische Rolle der Subtypen M1-M3 in der epithelialen Differenzierung, Ausprägung von Zell-Zell-Kontakten und Regulation des Zilienschlages in den Atemwegen untersucht. Hierzu wurde die Trachea von gendefizienten Mäusestämmen, welche jeweils einen dieser Rezeptorsubtypen nicht ausbilden, im Vergleich zu ihrem korrespondierenden Wildtyp erforscht. Messparameter waren relative Häufigkeit und Morphologie der individuellen Epithelzelltypen, Ausmaß und Struktur der Zell-Zell-Kontakte, die

Zilienschlagfrequenz und die Partikeltransportgeschwindigkeit, die mittels Licht- und Elektronenmikroskopie, Immunhistochemie und der hier etablierten neuen Methode zur Messung der Zilienschlagfrequenz und des epithelialen Partikeltransportes untersucht wurden.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse ergeben sich wichtige Erkenntnisse über die Funktion und Bedeutung der muskarinischen Rezeptoren im neuronalen und non-neuronalen cholinergen System und, daraus folgend, Möglichkeiten ihrer selektiven therapeutischen Beeinflussbarkeit im respiratorischen Epithel.

2 Literaturübersicht

2.1 Trachea

2.1.1 Das Trachealepithel in der Maus

Das Trachealepithel kleidet als innerste Schicht die gesamte Länge der Trachea aus. Histologisch betrachtet handelt es sich um ein mehrreihiges hochprismatisches Epithel, bei dem alle Zellen auf einer Basalmembran verankert sind, jedoch nicht jede Zelle das Lumen erreicht. Innerhalb des Trachealepithels lassen sich folgende Zelltypen voneinander unterscheiden: die zilientragende Zelle, die Basalzelle und bei den das Lumen erreichenden nicht-zilientragenden Zellen: die sekretorische Zelle, die endokrine Zelle, die Bürstenzelle und die Becherzelle.

2.1.1.1 Zelltypen im Trachealepithel

2.1.1.1.1 Morphologie der verschiedenen Zelltypen

Zilientragende Zelle

Die zilientragende Zelle reicht von der Basalmembran bis zum Lumen der Trachea und sitzt breit der Basalmembran auf (Pavelka et al. 1976). Sie ist vielgestaltig, meist von säulenartiger Form (Hansell und Moretti, 1969). Ihren Namen hat sie aufgrund der von ihrer Zelloberfläche in das Tracheallumen hervorragenden zahlreichen Kinozilien (Pavelka et al. 1976; Pack et al. 1980). Zusätzlich zu den Kinozilien trägt sie auf ihrer Oberfläche in unterschiedlicher Anzahl vorkommende Mikrovilli, die länger sind als die Mikrovilli auf der Oberfläche der nicht-zilientragenden Zellen (Pack et al. 1980). Ihr Zytoplasma erscheint überwiegend weniger elektronendicht als das der nicht-zilientragenden Zellen und wirkt daher im Anschnitt meistens heller als bei anderen Zelltypen (Hansell und Moretti 1969; Pack et al. 1980). Hansell und Moretti (1969) unterscheiden bei den zilientragenden Zellen neben diesem oben beschriebenen hellen Vertreter des Zelltyps einen selten vorkommenden auffällig dunklen zilientragenden Zelltyp.

Der Kern der zilientragenden Zelle liegt im unteren Drittel der Zelle (Pavelka et al. 1976) und weist meist eine runde bis ovale Form auf (Pack et al. 1980). Er besitzt ein helles Nukleoplasma, von dem sich die dunklen Aggregationen aus Chromatin gut sichtbar abheben (Pavelka et al. 1976; Pack et al. 1980). Im apikalen Teil der Zelle befinden sich zahlreiche Mitochondrien sowie große

Mengen an glattem und rauem endoplasmatischem Retikulum (ER) (Hansell und Moretti 1969; Pavelka et al. 1976; Pack et al. 1980). In der gesamten Zelle finden sich weiterhin zahlreiche Ribosomen, Lysosomen und in unterschiedlicher Anzahl vorkommende Vesikel, sowie ein gut ausgebildeter Golgi-Apparat (Hansell und Moretti 1969; Pavelka et al. 1976; Pack et al. 1980).

Basalzelle

Die Basalzelle ist der einzige Zelltyp im Trachealepithel, der nicht bis an das Lumen der Trachea heran reicht. Sie ist bei der Maus ähnlich wie bei anderen Spezies (Pack et al. 1980) meist von längsovaler Form und liegt breit der Basalmembran auf (Hansell und Moretti, 1969). In einigen Bereichen nimmt dieser Zelltyp den meisten Kontakt zur Basalmembran ein. Die Zelle beinhaltet einen großen Kern und das daraus resultierende große Kern/Zytoplasmaverhältnis ist typisch für diesen Zelltyp (Mariassy 1992). Ihr Zytoplasma enthält relativ wenige Organellen. Häufig sind freie Ribosome, glattes und raues ER, Mitochondrien, vereinzelte Vesikel und, in verschiedener Dicke und Verlaufsrichtung, Bündel von Tonofibrillen vorhanden (Hansell und Moretti 1969; Pavelka et al. 1976).

Sekretorische Zelle

Dieser sehr zahlreich vorkommende Zelltyp reicht von der Basalmembran bis zum Lumen. Ihre mit zahlreichen kurzen Mikrovilli besetzte Oberfläche wölbt sich weit in das Lumen der Trachea vor (Pavelka et al. 1976; Pack et al. 1980). Im Elektronenmikroskop erscheint ihr Zytoplasma elektronendicht und verleiht ihr damit ein dunkles Aussehen (Pavelka et al. 1976). Ihr meist ovaler, in der Mitte der Zelle liegender Kern besitzt häufig dunkel erscheinende Aggregationen von Chromatin (Pack et al. 1980). Die Zelle besitzt große Felder von glatten und rauem ER, große Mitochondrien und ausgedehnte Golgi Areale (Hansell und Moretti 1969; Pavelka et al. 1976; Pack et al. 1980). Im Zellapex befinden sich viele hell wirkende sekretorische Vesikel, weshalb die Vorstellung einer sekretorischen Funktion dieses Zelltypes auftrat (Hansell und Moretti 1969; Pack et al. 1980). Pack et al. (1980) beschreiben diese Zellen als Clara-like-Zellen, in Anlehnung an die sekretorisch aktiven Clarazellen bei anderen Spezies. Morphologisch finden sie, vor allem in der Ausbildung der sekretorischen Einschlüsse, dennoch Unterschiede zu den Clarazellen, so dass sie eine Einteilung

dieser Zellen in 3 Subtypen vornehmen (Pack et al. 1981). Laut Pack et al. (1981) lassen sich die unterschiedlichen Clarazellen anhand von Färbemethoden eindeutig von den sehr selten vorkommenden Mukus-produzierenden Zellen abgrenzen. Die Anzahl der Mukus-produzierenden-Zellen nimmt bis zur Bifurkation der Trachea zu, ist aber im Vergleich zu anderen Spezies doch sehr selten (Pack et al. 1981).

Endokrine Zelle

Die endokrine Zelle ist von variabler Gestalt, sitzt der Basalmembran auf und reicht bis zum Lumen der Trachea (Ericson et al. 1972). Ihr Zytoplasma ist auffällig wenig elektronendicht, so dass sie häufig schon an ihrer Helligkeit zu erkennen ist. An ihrer Oberfläche trägt diese Zelle Mikrovilli (Ericson et al. 1972; Taira und Shibasaki, 1978), die von Zelle zu Zelle in ihrer Anzahl und Länge variieren (Taira und Shibasaki, 1978). Der runde oder ovale Kern befindet sich im basalen Teil der Zelle, häufig umgeben von zahlreichen Mitochondrien und dem Golgi-Apparat (Ericson et al. 1972). Das Kennzeichen dieses Zelltyps ist die Anwesenheit von kugelförmigen Granula, die sich im basalen Teil der Zelle befinden (Ericson et al. 1972). Ericson et al. (1972) beschreiben die Granula mit elektronendichtem Inhalt, welcher von einer Membran umgeben ist. Zwischen dem Inhalt und der Membran der Granula befindet sich eine helle Zone, der sogenannte Halo. Taira und Shibasaki (1978) teilen die von ihnen gefundene Granula in zwei Arten ein. Zum einen gibt es große, irregulär geformte, mit dunklem Rand und Halo, zum anderen gibt es kleinere, dunkle Granula ohne Halo. Ericson et al. (1972) und Taira und Shibasaki (1978) sehen die Aufgaben dieses Zelltypes in endokrinen Funktionen und Ericson et al. (1972) bezeichnen sie als tracheobronchialer Gegenpart zu den endokrin aktiven intestinalen Kuldschitzkzellen.

Bürstenzelle

Die in der gesunden Trachea selten vorkommende Bürstenzelle reicht von der Basalmembran bis zum Lumen. Ihr Kennzeichen ist das auch bei anderen Spezies vorkommende dicht gepackte Büschel von langen Mikrovilli, von denen Filamentbündel bis in das Zytoplasma der Zelle reichen (Taira und Shibasaki, 1978; Pack et al. 1980). Ihr runder oder ovaler Kern sitzt im basalen Teil der Zelle und ihr Zytoplasma enthält glattes und raues ER, einen ausgeprägten Golgi-

Apparat und auffällig schmale Mitochondrien (Taira und Shibasaki 1978; Pack et al. 1980). Im apikalen Teil kann diese Zelle kleine membranumgebene, meist elektronen-dichte Vesikel enthalten (Jeffery und Reid 1975; Pack et al. 1980).

Laut Jeffery und Reid (1975) stellen die Vesikel keine sekretorischen Granula dar, sondern sind Zeichen einer absorbierenden Tätigkeit dieser Zelle. Dahingegen beschreiben Pack et al. (1980) die Funktion der Zelle in einer endokrinen Tätigkeit und Yoda (1976) sieht in den endokrinen Zellen und in der Bürstenzelle identische Zelltypen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien.

Becherzelle

Dieser sehr selten vorkommende Zelltyp zieht sich von der Basalmembran bis zum Lumen der Trachea. Ihre Oberfläche ragt weit in das Lumen vor, besitzt doch meist nicht die – wie ihr Name aussagt - Becherform (Mariassy 1992). Ihr Zytoplasma ist das elektronen-dichteste aller Zelltypen, was Pack et al. (1980) mit einer sehr großen Anzahl an vorkommenden Ribosomen begründen. Die Zelle besitzt einen basal gelegenen ovalen Zellkern und ihr Zytoplasma besitzt einen meist kernnah gelegenen Golgi-Apparat und raues ER (Hansell und Moretti 1969). Der Zellapex beinhaltet zahlreiche große membranumgebene Vesikel (Hansell und Moretti 1969; Pack et al. 1980). Laut Pack et al. (1980) handelt es sich dabei um muköse und seröse Vesikel, die unterschiedlich in ihrem Erscheinungsbild und ihrer Funktion sind. Ihre Zellfunktion wird in der Mitwirkung der Mukus-Erzeugung gesehen (Pack et al. 1980).

2.1.1.1.2 Häufigkeit und Verteilung der verschiedenen Zelltypen

Die prozentuale Zellverteilung der verschiedenen Zelltypen in der Mastrachea geben Pavelka et al. (1976) mit den nachfolgenden tabellarisch dargestellten Werten an (siehe Tab. 1). Es werden keine Unterschiede in der Lokalisation des Epithels in der Trachea gemacht. Im Epithel werden zilientragende Zellen, Basalzellen, indifferente Zellen (entsprechen den nicht-zilientragenden Zellen) und Becherzellen voneinander unterschieden.

Zelltyp	Häufigkeit (%)	SEM (%)
Zilientragende Zelle	36,3	$\pm 3,2$
Basalzelle	21,9	$\pm 2,9$
Indifferente Zellen	41,3	$\pm 4,6$
Becherzellen	0,5	$\pm 0,2$

Tab. 1: Mittlere relative Häufigkeit verschiedener Zelltypen im Trachealepithel der Maus mit Angabe des Standardfehlers (SEM), entnommen aus Pavelka et al. (1976)

Pack et al. (1980) unterteilen bei der Angabe der relativen Häufigkeit der verschiedenen Zelltypen das Trachealepithel in eine kehlkopfnahen Region, in eine Region nahe der Bifurkation und in das Epithel direkt über der Bifurkation. Es werden zilientragende Zellen, Clara-like Zellen, muköse Zellen, Bürstenzellen, Basalzellen und alle in diese Kategorien nicht einzuordnenden nicht-zilientragenden Zellen voneinander unterschieden (siehe Tab. 2-4).

Epithelzusammensetzung in der kehlkopfnahen Region

Zelltyp	Häufigkeit (%)
Zilientragende Zelle	37,6
Clara-like Zelle	53,2
Muköse Zelle	0,1
Andere nicht-zilientragende Zellen	3,6
Bürstenzelle	0,5
Basalzelle	5,0

Tab. 2: Relative Häufigkeit der verschiedenen Zelltypen im Trachealepithel der Maus über der kehlkopfnahen Region, entnommen aus Pack et al. (1980)

Epithelzusammensetzung nahe der Bifurkation

Zelltyp	Häufigkeit (%)
Zilientragende Zelle	39,3
Clara-like Zelle	49,4
Muköse Zelle	0,1
Andere nicht-zilientragende Zellen	0,7
Bürstenzelle	0,6
Basalzelle	9,8

Tab. 3: Relative Häufigkeit der verschiedenen Zelltypen im Trachealepithel der Maus über der Region nahe der Bifurkation, entnommen aus Pack et al. (1980).

Epithelzusammensetzung über der Bifurkation

Zelltyp	Häufigkeit (%)
Zilientragende Zelle	36,2
Clara-like Zelle	57,2
Muköse Zelle	0,5
Andere nicht-zilientragende Zellen	1,1
Bürstenzelle	0,5
Basalzelle	4,2

Tab. 4: Relative Häufigkeit der verschiedenen Zelltypen im Trachealepithel der Maus über der Bifurkation, entnommen aus Pack et al. (1980).

Neben der Häufigkeit der verschiedenen Zelltypen interessiert auch die Frage: Sind die Zellen über die Trachea homogen verteilt oder gibt es Regionen, in denen sich einzelne Zelltypen vermehrt finden? Bis zum heutigen Tage gibt es für die Verteilung der Zelltypen im Trachealepithel der Maus keine genauen Angaben. In Untersuchungen beim Hamster konnten Gabridge et al. (1977) zeigen, dass zilientragende Zellen vermehrt im Epithel über dem Trachealmuskel zu finden waren. Über dem Muskel konnten keine größeren Areale an nicht-zilientragenden Zellen gefunden werden. An der dem Oesophagus abgewandten Seite der Trachea und an den flankierenden Seiten beschreiben Gabridge et al. (1977) hingegen große Areale von nicht-zilientragenden Zellen und eine variable Menge an zilientragenden Zellen. Eine ähnlich inhomogene Verteilung konnten Oliveira et al. (2003) bei Untersuchungen an der Rattentrachea zeigen. Sie fanden Regionen im Epithel, die arm an zilientragenden Zellen waren. Diese konnten sie vor allem im Epithel über den Knorpelringen der Trachea zeigen und dort die errechnete relative Häufigkeit dieses Zelltyps mit 32% angeben. Im Gegensatz dazu fanden sie auch Regionen im Epithel, die sehr reich an zilientragenden Zellen waren. Diese konnten sie vor allem im Epithel über dem Bandteil der Trachea nachweisen und gaben hier die relative Häufigkeit dieser Zellen mit 65% an. Im Vergleich dazu war die relative Häufigkeit der sekretorischen Zellen genau gegenläufig. In den an zilientragenden Zellen armen Gebieten reduziert sich die Anzahl der zilientragenden Zellen von der Peripherie bis zum Zentrum der Trachea. Laut Oliveira et al. (2003) sind die Verteilung und Häufigkeit von

Bürstenzellen und den hier sogenannten unidentifizierbaren Zellen unabhängig von der Lokalisation des Epithels in der Trachea.

2.1.1.2 Zell-Zellkontakte im Trachealepithel

Die Zell-Zellkontakte zwischen allen Zellen im Trachealepithel bestehen aus drei Komponenten eines Verbindungskomplexes (Schneeberger und Lynch 1997). Weit apikal gelegen befindet sich als Verschlusskontakt die Zonula occludens oder tight junction. Etwas weiter basal gelegen ist der breite Adhäsionkontakt der Zonula adhaerens. Als letztes liegen noch etwas in basaler Richtung die Desmosomen oder Macula adhaerens (Schneeberger und Lynch 1997).

2.1.1.2.1 Zonula occludens

Die Zonula occludens ist ein gürtelförmig die Zelle umgebender Interzellularkontakt (Drenckhahn 2003), der durch leistenförmige (im Querschnitt punktförmige) Verschlusslinien der äußeren Lipidlamellen der Plasmamembran benachbarter Zellen charakterisiert ist (Drenckhahn 2003). Meistens können mehrere Verschlusslinien hintereinander beobachtet werden. Ihre Aufgabe sind der Verschluss und die Versiegelung des Interzellulärspaces, weshalb sie auch als Barrierekontakt bezeichnet werden. Die Molekularstruktur der Zonula occludens basiert auf integralen Membranproteinen, vornehmlich dem Occludin und der Familie der Claudine. Da die Occludens-Leisten einen passiven Übertritt von Ionen und anderen hydrophilen Molekülen zwischen den Zellen weitgehend verhindern, muss der Stoffdurchtritt durch epitheliale Grenzflächen mit Hilfe von Transportermechanismen der Zellen aktiv reguliert werden (Drenckhahn 2003).

2.1.1.2.2 Zonula adhaerens

Die Zonula adhaerens ist eine 0,1-0,5 µm breite Kontaktzone, die die Zelle wie ein Gürtel umgibt (Drenckhahn 2003) und den Interzellularspalt verengt (Schneeberger und Lynch, 1997). Der Interzellularspalt ist von mikroskopisch nur spärlich sichtbarem filamentärem Interzellulärmaterial erfüllt (Drenckhahn 2003) und erscheint unter dem Mikroskop etwas heller. Die Adhäsion der benachbarten Zellen wird durch Proteine der Familie der Cadherine, vor allem durch E- und N-Cadherin vermittelt. Auf der zytoplasmatischen Seite der Zellen befinden sich ein Bündel von Aktinfilamenten (Drenckhahn 2003), die in den Anschnitten unter dem Mikroskop dunkel erscheinen. Ihre Funktion ist die Sicherung des Kontaktes zwischen benachbarten Zellen.

2.1.1.2.3 Desmosomen

Das Desmosom ist ein weiterer Adhäsionskontakt. Es ist eine auffällige zytoplasmatische Verdichtungszone (Plaque), die von der Plasmamembran durch eine spaltförmige Aufhellungszone getrennt ist (Drenckhahn 2003). Unter dem Elektronenmikroskop ist deutlich der dunkle Plaque zu sehen. Er enthält eine Reihe unterschiedlicher Proteine sowie Interzellularfilamente (hauptsächlich Zytokeratine). Im Desmosom ist der Interzellularspalt mit filamentärem Material wie z.B. mit den Proteinen Desmoglein und Desmocollin gefüllt und verdichtet sich zu einer Mittellinie. Die Aufgabe der Desmosomen ist die mechanische Unterstützung der Kontakte benachbarter Zellen (Drenckhahn 2003).

2.1.1.3 Zilienmorphologie

Die Struktur der Zilien im Längs- und im Querschnitt der Maus entspricht der Zilienstruktur von Pflanzen, Tieren und Menschen (Lee und Forrest, 1997).

2.1.1.3.1 Der Zilienquer- und Zilienlängsschnitt

Der Zilienquerschnitt zeigt neun Mikrotubulusdoubletten, die ringförmig angeordnet und von einer Membran eingeschlossen sind. Im Zentrum befindet sich ein Mikrotubulusdoublett (Lee und Forrest, 1997). Jedes Doublett besteht aus einem kompletten A-Tubulus (zusammengesetzt aus 13 Protofilamenten) und einem inkompletten B-Tubulus (zusammengesetzt aus 11 Protofilamenten) (Drenckhahn 2003). Die Doubletten sind untereinander durch Verbindungsproteine (Nexinkomplex) verbunden. Jede Doublette steht durch die Speichenproteinkomplexe mit einem Proteinkranz (innere Scheide) in Kontakt, der die zentralen beiden Mikrotubuli umhüllt. Die Bewegung der Kinozilien erfolgt durch Gleitbewegungen zwischen benachbarten Mikrotubulusdoubletten, die durch das Mechanoprotein Dynein bewerkstelligt werden (Drenckhahn 2003).

Im Längsschnitt beinhaltet der Zilienschaft longitudinal angeordnete Mikrotubuli (Axonema), eingebettet in Zytoplasma und von einer Membran umgeben (Lee und Forrest 1997). An der Spitze der Zilien, hier bei der Ratte und beim Menschen beschrieben, befinden sich klauenartige Fortsätze, deren Funktion möglicherweise in der Unterstützung des mukoziliären Transportes zu finden ist (Sleigh 1982; Lee und Forrest 1997). Laut Sleigh (1982) verstärken diese klauenartigen Fortsätze den Mukustransport, indem während des effektiven

Schläges die Zilienspitze mit den Fortsätzen genau in die Mukusschicht greift und den Mukus während ihrer Vorwärtsbewegung in Richtung Kehlkopf schiebt.

Im Inneren des Zilienschafes enden die peripheren Doubletten im sogenannten Basalkörper. Dort wird aus den Doubletten ein Triplett, da ein weiterer Tubulus angelagert wird. Von der mittleren Region des Basalkörpers ragt ein seitlicher Fuß in das Zytoplasma. Laut Lee und Forrest (1997) ist die gleiche Ausrichtung der Fußrichtung wichtig für die Koordination des Zilienschlages, da z.B. bei Personen mit dem `immobile-cilia Syndrom` diese Füße eine ungleiche Anordnung besitzen. Von der basalen Seite des Basalkörpers ragen sogenannte Wurzelfasern zur Verankerung des Axonema in das Zytoplasma der Zelle (Lee und Forrest, 1997).

Das zentrale Mikrotubuluspaar von benachbarten Zellen ist stets in gleicher Richtung angeordnet, was eine Rolle bei der Richtung des Zilienschlages zu spielen scheint (Lee und Forrest, 1997).

2.1.2 Das Trachealsekret

Das Trachealsekret benetzt das Innere der Luftröhre und erfüllt wichtige Aufgaben bei der mukoziliären Clearance (MC). Es fungiert als mechanische Barriere, an dem Fremdkörper anhaften und durch den Zilienschlag kehlkopfwärts transportiert und entfernt werden. Weiterhin wirkt das Sekret u.a. durch seine antioxidative Wirkung als chemisches Hindernis und durch z.B. Mikroorganismen vernichtende Entzündungszellen als biologische Barriere (Wanner et al. 1996). Das Sekret kann in zwei Schichten eingeteilt werden: Direkt an der Zelloberfläche in eine Muzin-freie „Sol“ Schicht oder auch „periziliäre Flüssigkeitsschicht“ und in eine darüberliegende „Gel“ oder Muzinschicht (Knowles und Boucher, 2002). Die wässrige periziliäre Flüssigkeitsschicht ermöglicht durch ihre geringe Viskosität den schnellen Zilienschlag (Knowles und Boucher, 2002), während die visköse Muzinschicht von den Zilienspitzen effektiv transportiert werden kann (Wanner et al. 1996). Die große Bedeutung der Schleimschicht für den Ablauf der MC zeigen Sleigh et al. (1988), indem sie nach Entfernen der Mukusschicht und Ersetzen durch eine Ringerlösung eine Reduktion des Partikeltransportes ohne Veränderung der Zilienschlagfrequenz (ZSF) messen konnte. Laut Wanner et al. (1996) kann keine ziliäre Clearance ohne eine Mukusschicht stattfinden. Es wurde daher postuliert, dass es für die MC einer Signalgebung zwischen zilientragenden

Zellen und sekretorischen Zellen bedarf. Diese Signalgebung läuft entweder mittels Ca^{2+} -Wellen über die die Zellen verbindenden gap-junctions oder über die Ausschüttung parakrin wirkender Botenstoffe (Wanner et al. 1996).

Laut Wanner et al. (1996) sind jedoch nur beide Schichten des Trachealsekretes in Kombination für den effektiven Abtransport gebundener Partikel verantwortlich. Vereinfacht kann gesagt werden: Ist die periziliäre Flüssigkeitsschicht zu tief, können die Zilienspitzen nicht die Muzinschicht erreichen und damit keinen Abtransport der Muzinschicht mit den in ihr gebundenen Partikeln herbeiführen. Ist aber umgekehrt die Schicht zu niedrig, verhindert die zähe Muzinschicht den effektiven Vorwärts- und Rückwärtsschlag der Zilien. Dem widersprechen aber Befunde von Kerem et al. (1999), die in Patienten mit einer mehr als das doppelte Volumen betragenden periziliären Flüssigkeit eine normale oder in einem Drittel sogar eine erhöhte mukoziliäre Transportrate zeigen.

2.1.3 Der Zilienschlag

2.1.3.1 Ablauf, Koordination und Beeinflussung

Der Zilienschlag im Trachealepithel wird durch die aktive Bewegung der Kinozilien zilientragender Zellen verursacht. Der Schlag der Zilien ist kehlkopfwärts gerichtet (Wanner et al. 1996) und lässt sich in einen effektiven, fast senkrecht ausgeführten Vorwärtsschlag und in eine seitliche Rückholbewegung einteilen (Wanner et al. 1996). Dabei ist das Zilium während des Vorwärtsschlags gestreckt (Wanner et al. 1996), nicht jedoch während der seitlichen Rückholbewegung. Der effektive Schlag wird bis zu 4x so schnell (Drenckhahn 2003) wie die Rückholbewegung ausgeführt. Zwischen der Vorwärts- und Rückholbewegung rastet das Zilium kurz, jedoch nicht beim Übergang der Rückholbewegung in den Vorwärtsschlag (Wanner et al. 1996). Bei Erhöhung der Schlagfrequenz werden alle Ablaufphasen verkürzt, besonders dabei jedoch die kurze Rast und die Rückholbewegung (Sanderson und Dirksen, 1985). Ermöglicht wird die Pendelbewegung der Zilien durch Zyklen von Haften, Abknicken und anschließender Ablösung der Dyneinköpfe vom B-Tubulus, was das Gleiten benachbarter Doubletten ermöglicht (Drenckhahn 2003). Um aber Schleim oder Partikel gerichtet zu transportieren, müssen die einzelnen zilientragenden Zellen den effektiven Schlag koordiniert in Richtung Kehlkopf ablaufen lassen (Wanner et al. 1996). Zusätzlich bedarf es einer zeitlichen

Schlagkoordination zwischen den weiter thorakal gelegenen zilientragenden Zellen und den weiter zervikal gelegenen zilientragenden Zellen (Wanner et al. 1996). Nur dann ist der Schleimtransport kehlkopfwärts gewährleistet. Der Mechanismus des gerichteten Schlages ist noch nicht vollständig geklärt: Bei der einzelnen Zelle ist am Verbreitesten die sogenannte „switch point“-Hypothese von Satir und Matsuoka (1989). Darin wird in der Zelle der gerichtete Transport ermöglicht, indem während des Vorwärtsschlages die Dyneinärmchen der einen Zilienhälfte und während der Rückholbewegung die Dyneinärmchen der anderen Zilienhälfte agieren. Der basale Fuß am mittleren Teil des Basalkörpers zeigt meistens in die Richtung des effektiven Zilienschlages (Lee und Forrest, 1997). So dient er möglicherweise zur Orientierung der Schlagrichtung der einzelnen zilientragenden Zelle (Lee und Forrest, 1997). Durch gleichmäßige Anordnung der basalen Füße benachbarter zilientragender Zellen wird die einheitliche Schlagrichtung in der Trachea ermöglicht (Lee und Forrest, 1997). Der Transport des Schleimes von thorakal nach laryngeal erfolgt aufgrund einer Metachronie, d.h. einer zeitlich versetzten Wellenbewegung der zilientragenden Zellen (Sleigh 1982). Eine tragende Rolle zur Wellenerzeugung spielt nach Sleigh (1984) die Berührung der Zilien einer zilientragenden Zelle mit den Zilien der benachbarten zilientragenden Zelle während ihrer Rückholbewegung. Diese Berührung stimuliert die berührte Zelle ebenfalls - etwas zeitlich versetzt - die Rückholbewegung einzuleiten und den Zilienschlag auszuführen. Allerdings konnten Gheber und Priel (1989) koordinierte zilientragende Zellen nachweisen, die aufgrund eines zu großen Abstandes zwischen ihnen keine Berührung der Zilien aufweisen konnten. Sleigh (1982) teilt aufgrund rasterelektronenmikroskopischer Untersuchungen am Kaninchen die zilientragenden Zellen der Trachea in unterschiedlich aktive Gebiete ein, welche in ihrem Rhythmus unabhängig voneinander agieren. Die Koordination der zilientragenden Zellen eines Gebietes sieht Sleigh (1982) ebenfalls durch Stimulation der benachbarten zilientragenden Zelle während der Rückholbewegung einer bereits aktiven Zelle.

Bis heute sind die Faktoren zur Koordination und Synchronisation aber nicht endgültig geklärt. Untersuchungen zeigen, dass die Koordination der zilientragenden Zellen bis zur Entwicklung der Säugetiere abgenommen hat

(Gheber und Priel 1989). Um die Synchronisation zwischen zwei getrennt liegenden zilientragenden Zellarealen berechnen zu können, entwickelten Gheber und Priel (1989) einen Korrelationskoeffizienten. So konnten eine abnehmende Synchronisation bei größerer Distanz zweier Zellen und die Existenz mehrerer Wellenbewegungen mit unterschiedlicher Wellenlänge zu einem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Zu jedem Zeitpunkt existieren aber immer einige unkorreliert schlagende zilientragende Zellen (Gheber und Priel 1989). Neben diesen unkorreliert schlagenden Zellen gibt es laut Sleight (1982) zilientragende Zellen, die über die gesamte Zeit aktiv schlagen. Diese stimulieren z.B. bei Erhöhung der Schleimviskosität über ihre Rückholbewegung mehrere zilientragende Zellen, die dann gemeinsam effektiv den Schleim transportieren können. Sleight (1982) sieht darin eine Summierung der Effekte der einzelnen Zellen, gibt aber keine Angaben, ob sich möglicherweise die Schlagkraft der einzelnen Zellen verändern könnte. Sleight (1983) beschreibt die Anpassung der zilientragenden Zellen an veränderte Umgebungsbedingungen mit einer Erhöhung der Schlagrate. Diese sieht er als direkten Reiz auf die veränderten Bedingungen und weniger hervorgerufen durch neurale Aktivierungsmechanismen.

Eine aktive Beeinflussung des Bewegungsablaufes eines Zilienschlages - ob mit oder ohne Beeinflussung der ZSF - ist bisher noch nicht beschrieben worden. In den bisherigen Veröffentlichungen wird bei Manipulation durch exogene Zugabe verschiedenster Substanzen, mechanischen Reizungen oder nervalen Stimulationen stets der Fokus auf die Frequenz der zilienschlagenden Zellen gerichtet und nicht auf den Mechanismus des Schlagablaufs.

2.1.3.2 Pathophysiologie

Ein gestörter Ablauf des Zilienschlages bis zum völligen Stillstand des Zilienschlages kann krankheitsbedingt durch verschiedene Ursachen hervorgerufen werden. Häufig ist dann aber nicht nur der Ablauf des Zilienschlages verändert, meist findet sich in Kombination eine veränderte ZSF. Bei den Ursachen kann man primäre, d.h. genetisch bedingte Erkrankungen, von sekundären, d.h. nicht genetisch bedingten Erkrankungen, unterscheiden (Lee und Forrest, 1997). Zu den ersteren zählt vor allem die primäre ziliäre Dyskinesie, deren pathogenetische Grundlage veränderte Dyneinarme, Radspeichendefekte oder das Fehlen des zentralen Doppeltubuluspaars in den Zilien ist. Für die

Atemwege bedeutet es eine ineffektive Beweglichkeit, eine Bewegungsstörung oder eine völlige Unbeweglichkeit der Zilien des gesamten respiratorischen Systems. Dies verhindert u.a. einen effektiven mukoziliären Transport, was sich häufig in Form einer chronischen Bronchitis und ausgeprägten Bronchoektasien äußert (Lee und Forrest, 1997). Zu den sekundären Ursachen zählen vor allem Infektionen, Allergien, traumatische Zerstörung des Epithels, toxische Ursachen und Tumorerkrankungen (Lee und Forrest, 1997). Diese Erkrankungen rufen u.a. verklebte Zilien, disorganisierte Axoneme, lose oder schlaffe Zilien hervor. Ein hervorzuhebendes Beispiel ist die Zilienschädigung nach Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*. Hingley et al. (1986) konnten irreversible Veränderungen der Ultrastruktur nach Zugabe eines bakteriellen Produktes von *Pseudomonas aeruginosa* mit gefolgter irreversibler Ziliostasis zeigen. Je nach Schwere der Veränderungen äußern sich die Erkrankungen in einer Reduktion der MC, verbunden mit Husten, Bronchitis und einer allgemein erhöhten Infektanfälligkeit (Lee und Forrest, 1997). Patienten mit zystischer Fibrose besitzen, außer bei zusätzlichen Entzündungsprozessen, einen unveränderten Ablauf des Zilienschlages (Lee und Forrest, 1997).

2.1.4 Die Zilienschlagfrequenz

2.1.4.1 Ablauf, Regulation und Beeinflussung

Die Schlagfrequenz der zilientragenden Zellen im Trachealepithel der Maus beträgt bei 30°C $15,6 \pm 0,7$ Hz (Zhang et al. 2004). Bei diesen Messungen ist die Angabe und Einhaltung der Temperatur für einen Vergleich äußerst wichtig, da die Schlagfrequenz sehr temperaturabhängig ist (Sleigh et al. 1988). So ergaben Messungen bei Ratten mit einer Temperatur von 25°C die Frequenz von 10,9 Hz, bei einer Temperatur von 35°C die Schlagfrequenz von 19,8 Hz (Sleigh et al. 1988). Neben der Temperaturabhängigkeit der Schlagfrequenz ist der Ort der Frequenzmessung entscheidend. Die Schlagfrequenz der zilientragenden Zellen in der Trachea ist deutlich niedriger als die Schlagfrequenz der zilientragenden Zellen der intrapulmonalen Atemwege (Delmotte und Sanderson, 2006). Neben der unterschiedlichen Grundfrequenz unterscheiden sich auch die Regulation und Beeinflussung der Schlagfrequenz in den oberen von denen in den unteren Atemwegen (Delmotte und Sanderson, 2006). In Lungenschnitten war es nicht möglich, die Schlagfrequenz durch Adenosintriphosphat (ATP)-Zugabe zu

verändern, im Gegensatz zur Schlagfrequenz der zilientragenden Trachealzellen. Hier steigerte die Zugabe von ATP in einer Konzentration bis 20 μM die ZSF im Mittel um 45% (Delmotte und Sanderson, 2006). Auch Hayashi et al. (2005) zeigten, dass sogar die Zugabe von ATP in einer Konzentration von 100 μM die Schlagfrequenz in Lungenschnitten nicht wie im Trachealepithel steigern konnte. Ebenso zeigten Hayashi et al. (2005), dass die Zugabe von ACh in einer Konzentration von 100 μM die Schlagfrequenz in der Trachea steigerte, jedoch nicht die Schlagfrequenz in Lungenschnitten. Diese unterschiedlichen Reaktionen deuten Delmotte und Sanderson (2006) und Hayashi et al. (2005) als wichtigen Mechanismus, um eine optimale MC aufrechterhalten zu können und Fremdkörper effektiv entfernen zu können. Die hohe Grundschlagfrequenz der kleinen Atemwege erlaubt den optimalen Transport von eingeatmeten Partikeln zurück in die Trachea. Dort kann dann im Bedarfsfall durch eine Regulation der ZSF die mukoziliäre Transportrate angepasst werden (Delmotte und Sanderson, 2006).

Zilientragende Zellen können auf veränderte Eigenschaften des Mukus reagieren. So reagieren sie auf eine erhöhte Schleimproduktion mit einer Erhöhung der Schlagrate, um einen gesteigerten Transport des Mukus gewährleisten zu können (Sleigh 1983). Winters et al. (2007) zeigten, dass induzierter mechanischer Stress am Trachealepithel ebenfalls die ZSF erhöhen konnte. Den Grund vermuteten sie in einer ATP-Ausschüttung und der damit verbundenen Steigerung der ZSF. Vermittelt werden soll die durch ATP-induzierte Steigerung über P2X und P2Y Rezeptoren, die einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg und dadurch eine Erhöhung der ZSF vermitteln (Hayashi et al. 2005).

Die Zugabe von Atropin erbrachte bei Untersuchungen der ZSF im Nasenepithel des Menschen eine Abnahme der ZSF um im Mittel 24,79% (Centanni et al. 1998).

Doch gibt es eine direkte nervale Steuerung der ZSF? Untersuchungen am Froschgaumen zeigen eine Aktivierung von zuvor untätigen zilientragenden Zellen durch eine Stimulation des Nervus palatinus (Sleigh et al. 1988). Unklar bleibt dabei allerdings, ob die Aktivierung der ZSF nicht aufgrund einer erhöhten Mukusproduktion aufgetreten ist (Sleigh et al. 1988). Stimulationen des Nervus vagus in Schildkröten und Enten führten nicht zu Veränderungen der trachealen

ZSF (Sleigh et al. 1988). Eine veränderte Mukusproduktion konnte durch Vagusstimulation nachgewiesen werden (Sleigh et al. 1988). Möglicherweise führt wieder diese Veränderung der Mukusproduktion zu einer Veränderung der ZSF. So ist es auch sehr schwierig, eindeutig die direkte Wirkung von Cholinergika auf die ZSF nachweisen zu können. Auch diesen wird eine Erhöhung der Mukusproduktion nachgesagt, so dass wiederum über diesen indirekten Mechanismus eine Beeinflussung der ZSF zustande gekommen sein könnte (Sleigh et al. 1988). Ob nun über den Mechanismus der gesteigerten Mukusproduktion oder über die direkte Beeinflussung der ZSF, zahlreiche Studien machen die bedeutende Rolle der muskarinische Rezeptoren (MR) für die ZSF deutlich. Pharmakologische Studien von Wong et al. (1988a + 1988b) zeigen in vitro an Rindertracheen und in vivo an Hundetracheen eine Steigerung der ZSF durch Zugabe des MR Agonisten Methacholin. Zur Identifizierung der einzelnen Rezeptorsubtypen an der Regulation der ZSF führten Yang und McCaffrey (1996) pharmakologische Experimente mit möglichst selektiven Rezeptoragonisten an Zellkulturen des menschlichen Nasenepithels durch. Sie vermuteten eine Beteiligung der M1 und M3 Rezeptorsubtypen, nicht jedoch des M2 Rezeptorsubtypen, während Salathe et al. (1997) anhand von Untersuchungen an kultivierten ovinen Trachealzellen nur den M3 Rezeptorsubtyp an der Regulation der ZSF beteiligt sehen. So wurden bis heute keine selektiven Befunde erhoben, die eindeutige Rückschlüsse auf die Beteiligung der verschiedenen MR Subtypen zulassen.

2.1.4.2 Pathophysiologie

Pathologische Veränderungen der Zilien führen häufig zu einer veränderten ZSF. Diese Veränderungen und andere Ursachen einer veränderten ZSF wurden bereits unter dem Kapitel 2.1.3.2 „Zilienschlag: Pathophysiologie“ aufgeführt. Ebenso wie die Ausführung des Zilienschlages ist die ZSF in Patienten mit zystischer Fibrose unverändert (Lee und Forrest, 1997). Erwähnenswert ist an dieser Stelle noch die Bedeutung bestimmter bakterieller Erkrankungen für die ZSF. So konnte z.B. in Patienten mit Pseudomonadeninfektion eine stark reduzierte ZSF gemessen werden. Um aber eine Reduzierung der ZSF zu bewirken, mussten die Bakterien direkt an den Zilien haften (Knowles und Boucher, 2002). Dieser Aussage stehen frühere Veröffentlichungen von Hingley (1986) und Seybold et al.

(1992) entgegen, in denen bereits bakterielle Produkte die Zilienfunktion und damit die ZSF beeinflussen. Hingley (1986) zeigt eine Hemmung der Zilienfunktion, hervorgerufen durch bakterielle Produkte von *Pseudomonas aeruginosa*, und Seybold (1992) präsentiert eine Verringerung der trachealen Mukusgeschwindigkeit, ebenfalls verursacht durch bakterielle Produkte von *Pseudomonas aeruginosa*.

2.1.5 Mukoziliäre Clearance

2.1.5.1 Physiologie und Pathophysiologie

Die MC ist ein Selbstreinigungs- und Verteidigungsmechanismus der Atemwege gegenüber eingedrungenen Partikeln, Mikroorganismen und Noxen (Wanner et al. 1996). Diese können durch Schleimsekretion und einen oral gerichteten Zilienschlag aus den Atemwegen entfernt werden. Partikel, Mikroorganismen und Noxen kommen auf der Oberfläche des schleimigen Trachealsekretes zum Liegen und bleiben an diesem haften. Das Sekret wird durch einen koordinierten Schlagablauf der zilientragenden Zellen (siehe Kapitel 2.1.3.1 „Zilienschlag: Ablauf, Koordination und Beeinflussung“) in Richtung Kehlkopf transportiert (Wanner et al. 1996) und kann dort entweder geschluckt oder abgehustet werden. Die Effektivität dieses Reinigungsvorganges ist abhängig von der Interaktion der Zilien mit dem über ihnen liegenden Mukus. Wichtige Parameter für einen erfolgreichen Partikeltransport sind laut Knowles und Boucher (2002) vor allem die ZSF und die richtige Quantität und viskoelastische Eigenschaft des Trachealsekretes. Die Kontrolle der MC unterliegt laut Knowles und Boucher (2002) autokrinen und parakrinen Signalen, von denen verschiedene Zellfunktionen von den MR M1, M2 und M3 vermittelt werden (Wanner et al. 1996). Einen cholinergen Einfluss auf die MC bestätigen auch Untersuchungen, die einen Anstieg der MC nach Gabe eines cholinergen Agonisten zeigen konnten (Knowles und Boucher, 2002). Obwohl das Trachealepithel überwiegend parasympathisch innerviert ist, wird eine neurale Regulation nicht angenommen (Wanner et al. 1996). Dieser Vermutung liegen Untersuchungen an Hunden zu Grunde, bei denen trotz einer Vagotomie die mukoziliäre Funktion unverändert war. Auch Rezeptorantagonisten des autonomen Nervensystems erbrachten keine Veränderungen der mukoziliären Funktion, mit Ausnahme von Atropin (Wanner et al. 1996). Bei Zugabe von Atropin beschreiben einige Autoren eine

Verminderung des mukoziliären Transportes (Wanner et al. 1996). Diese Verminderung des mukoziliären Transportes wird nicht durch eine Veränderung der physikalischen Eigenschaften des Trachealsekretes hervorgerufen. Es wird, obwohl nicht einheitlich beschrieben, eine Hemmung der Zilienaktivität vermutet (Wanner et al. 1996).

Genetisch bedingte Erkrankungen, die mit einer veränderten MC einhergehen, sind vor allem die primäre ziliäre Dyskinesie und die zystische Fibrose (Knowles und Boucher, 2002). Die primäre ziliäre Dyskinesie äußert sich in einer angeborenen, durch Gendefekte hervorgerufene abnormalen Zilienstruktur und Zilienfunktion (Knowles und Boucher, 2002). Diese bedingen einen verminderten ziliären Transport, der von den betroffenen Patienten durch eine Husten-abhängige MC relativ gut ausgeglichen werden kann (Knowles und Boucher, 2002). Trotzdem leiden diese Patienten an chronischen Atemwegsinfektionen, die aber meist einen milderen Verlauf besitzen als bei Patienten mit zystischer Fibrose (Knowles und Boucher, 2002).

Keine Veränderungen in der Zilienstruktur und Zilienfunktion zeigen Patienten mit einer zystischen Fibrose (Lee und Forrest, 1997). Bei diesen Patienten liegt ein Gendefekt vor. Das betroffene Gen CFTR (für cystische-Fibrose-Transmembran-Regulatorprotein) codiert ein Eiweißmolekül, das in der Zellmembran als Chloridkanal fungiert (Knowles 2006). Durch den Defekt im Gen wird das Protein verändert und die Kanalfunktion gestört. Bedingt durch die gestörte Kanalfunktion ist die Viskosität des Mukus stark erhöht (Lee und Forrest, 1997). Dies führt dazu, dass der Schleim nicht oder nur sehr schlecht aus den Atemwegen abtransportiert oder abgehustet werden kann.

Neben genetisch bedingten Erkrankungen kann eine mikrobielle Infektion die MC negativ beeinflussen. In vielen Tierarten und im Menschen konnte eine verminderte MC nach einer bakteriellen Infektion mit Pseudomonaden nachgewiesen werden (Knowles und Boucher, 2002). Bei weiteren Studien an Patienten mit bakteriellen Infektionen wird als Folge eine verminderte ZSF beschrieben. In diesen Studien wurden keine Aussagen über die Auswirkung auf die MC getroffen (Knowles und Boucher, 2002). Die Auswirkung von allergenen Erkrankungen ist abhängig von den auftretenden Entzündungsmediatoren. So wurde z.B. eine Verminderung der mukoziliären Transportgeschwindigkeit nach

Einwirkung von Leukotrien D₄ in Schafen gemessen. Ebenso wurde bei Schafen und im Menschen nach Einwirkung des Plättchen-aktivierenden-Faktors (PAF) eine Abnahme der Geschwindigkeit gemessen. Andererseits stimulierte der Entzündungsmediator Histamin die MC (Knowles und Boucher, 2002).

2.2 Muskarinische Rezeptoren in der Trachea

2.2.1 Einteilung muskarinischer Rezeptoren

ACh vermittelt seine Wirkung über zwei verschiedene Gruppen von Rezeptoren. Diese sind benannt nach ihren zwei selektiven Agonisten. Zum einen gibt es die Gruppe der nikotinischen Rezeptoren, benannt nach Nikotin, dem Alkaloid der Tabakpflanze, zum anderen gibt es die Gruppe der muskarinischen Rezeptoren (MR), benannt nach Muskarin, dem Alkaloid des Fliegenpilzes (Starke 1996). Die erste Angabe über die Existenz der MR erfolgte bereits 1951 durch Untersuchungen am Herzen von Riker und Wescoe (Caulfield und Birdsall, 1998). Mit der Zulassung von Pirenzepin, einem Arzneimittel zur Behandlung von Magengeschwüren, war es offensichtlich, dass die MR-vermittelte Reaktion von ACh nicht nur über einen einzigen Rezeptortyp ausgeführt werden konnte (Caulfield 1993). Bis zum heutigen Tage sind 5 Rezeptorsubtypen, M1-M5, anhand 5 klonierter Gene (Gen m1-m5) identifiziert worden (Caulfield und Birdsall, 1998). Bis zur Entwicklung moderner molekularbiologischer Methoden war die Erforschung der Wirkung und Funktion der verschiedenen Rezeptorsubtypen vor allem anhand pharmakologischer Studien von Rezeptoragonisten und Rezeptorantagonisten durchgeführt worden (Caulfield und Birdsall, 1998). Daran orientierte sich auch die Nomenklatur der Rezeptoren: Wurden die Rezeptoren oder deren Wirkung anhand von pharmakologischen Methoden benannt, erfolgte die Nomenklatur durch ein großes M mit nachfolgender Nummer. War das Gen oder das Genprodukt des Rezeptors bekannt, wurde ein kleines m mit nachfolgender Nummer geschrieben (Caulfield und Birdsall, 1998). Heute wird zur Beschreibung der Rezeptoren auf pharmakologischer und molekularbiologischer Ebene die einheitliche Kennzeichnung M1, M2, M3, M4 und M5 empfohlen (Caulfield und Birdsall, 1998).

Heutzutage ist es in Mäusen möglich, das für jeden MR Subtyp verantwortliche Gen auszuschalten und dadurch sogenannte MR Knock-out Mäuse (KO-Mäuse)

zu erzeugen. Bisher erlauben nur diese Tiermodelle ein spezifisches Erforschen der Wirkung und Funktion der einzelnen Rezeptorsubtypen.

2.2.2 Aufbau und Signaltransduktion muskarinischer Rezeptoren

Die meisten Gewebe exprimieren mehr als einen Rezeptorsubtyp (Wess 2004). In den Atemwegen, wie für Mäuse, Ratten und den Menschen beschrieben, sind die dominanten Rezeptoren die M1, M2 und M3 Rezeptorsubtypen (Fryer und el-Fakahany 1990; Barnes 1993; Garssen et al. 1993). Eine erwähnenswerte Ausnahme ist das Vorkommen des M4 Rezeptorsubtypen in den Atemwegen des Kaninchens (Barnes 1993).

Alle MR gehören zur Familie der Guaninnukleotid-bindenden-Protein (G-Protein)-gekoppelten Rezeptoren (Caulfield und Birdsall, 1998). Obwohl zu dieser Familie mittlerweile Tausende von verschiedenen Rezeptoren gehören (Hamm 1998), besitzen alle Mitglieder folgende charakteristische Bausteine in ihrer Struktur (Strader et al. 1994; Caulfield und Birdsall, 1998):

- Sieben Transmembrandomänen in α -Helixform aus jeweils 20-25 Aminosäuren. Von den sieben Domänen sind 3 senkrecht und 4 in dazu scharfen Winkel angeordnet.
- Intra- oder extrazelluläre Schleifen, welche die sieben Membrandomänen miteinander verbinden
- Die Domäne, die den Liganden erkennt, liegt extrazellulär.
- Zwei konservierte Cystein-Reste, die eine Disulfidbrücke zwischen der ersten und dritten extrazellulären Schleife formen und eine wichtige Aufgabe bei der Funktion des Rezeptors besitzen
- Ein extrazelluläres aminotermiales Ende (N-Terminus) und ein intrazelluläres Carboxy-termiales Ende (C-Terminus)

Die Übereinstimmung der Primärstruktur der Transmembrandomänen bewegt sich im Bereich von 85-95% innerhalb einer Spezies für einen Rezeptortyp (Beispiel: M3 Rezeptor bei der Maus), im Bereich von 60-80% für Subtypen eines Rezeptors (Beispiel: M1-M5 Rezeptorsubtypen) und über 35-45% für andere Rezeptoren aus derselben Familie (Beispiel: verschiedene Rezeptoren der G-Protein gekoppelten Familie) (Strader et al. 1994).

Auf der zytoplasmatischen Seite ist der Rezeptor an ein G-Protein gekoppelt, das verantwortlich für die weitere Signaltransduktion ist. G-Proteine bestehen aus

einer α -, β - und γ -Untereinheit. Die α -Untereinheit enthält eine Bindungsstelle für Guanosindiphosphat (GDP) bzw. Guanosintriphosphat (GTP). Ist das heterotrimere G-Protein inaktiv, ist es mit der Zellmembran assoziiert und bindet an GDP. Für die Bindung an die Zellmembran sind die β - und γ -Untereinheit mit ihren vielen hydrophoben Aminosäuren verantwortlich (Strader et al. 1994; Fichtl et al. 1996). Wenn ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor einen Liganden (im Falle der MR z.B. Muskarin) bindet, so verändert sich seine Konformation derart, dass ein passendes G-Protein an ihn binden kann. Diese Bindung begünstigt den Austausch des an die α -Untereinheit gebundenen GDP gegen GTP (Fichtl et al. 1996). Nach diesem Austausch dissoziiert das G-Protein wieder vom Rezeptor ab und zerfällt in die α -Untereinheit und in die β - γ -Untereinheit (Fichtl et al. 1996). Weiterhin verändert der Austausch drei flexible Regionen der α -Untereinheit. Dadurch besitzt die GTP-gebundene α -Untereinheit nun eine geringere Affinität zur β - und γ -Untereinheit und trennt sich von diesen (Hamm 1998). Die β - und γ -Untereinheiten bilden eine funktionelle Einheit, die nur durch Denaturierung auseinander gerissen werden kann (Hamm 1998). Die $G\alpha$ -Untereinheit besitzt nun eine gesteigerte Affinität zu zellulären Effektorproteinen (Hamm 1998) und moduliert durch deren Aktivierung/Hemmung zahlreiche zelluläre Prozesse (Strader et al. 1994). Bis zum heutigen Tage sind zahlreiche verschiedene α -, β - und γ - Untereinheiten identifiziert worden, eine grobe Einteilung fasst Hamm (1998) wie folgt zusammen: G_s , welche als Effektorproteine die Adenylatcyclase (AC) aktivieren; G_i , welche als Effektorproteine die AC inhibieren; G_q , welche als Effektorproteine die Phospholipase C (PLC) aktivieren. Dazu noch einige Untereinheiten mit bisher unbekannter Funktion. Bei den MR koppeln die M1, M3 und M5 Subtypen vorzugsweise mit der Unterfamilie der G_q -Proteine, während die M2 und M4 Subtypen vorzugsweise mit der Unterfamilie der G_i -Proteine koppeln (Caulfield 1993). Einheitlich bei allen Unterfamilien ist, dass die α -Untereinheit selbst GTPase-Aktivität besitzt. Dadurch kann das α GTP durch Phosphatabspaltung in α GDP übergehen und sich durch diesen Mechanismus selbst inaktivieren. Für diesen Vorgang wurden in vitro Halbwertszeiten von 10-20 sec gemessen (Fichtl et al. 1996). Nach erfolgter Reassoziaton mit einer passenden β , γ -Untereinheit steht das G-Protein für einen weiteren Signalübermittlungszyklus zur Verfügung (Fichtl et al. 1996). In ihrer aktiven Zeit

kann die α -Untereinheit viele Effektorproteine aktivieren und damit eine chemische Verstärkung des auf die Zelle auftreffenden Signals auslösen (Fichtl et al. 1996). Neben der agierenden α -Untereinheit gibt es immer mehr Hinweise, dass die MR ihre Effekte zusätzlich über die β - und γ -Untereinheiten vermitteln. So kann man auch eine Aktivierung der PLC und der AC, das Öffnen von K^+ -Kanälen und eine Inhibierung von neuronalen Kanälen auf Aktivitäten der β - und γ -Untereinheit zurückführen (Caulfield 1993).

Die Kopplung der MR an ihre bevorzugten G-Proteine löst die zelluläre Signalkaskade aus. Die Aktivierung der PLC resultiert in einer Hydrolyse des membranintegrierten Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat mit Bildung der second messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) (Caulfield 1993). IP_3 erhöht durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration, wodurch eine große Anzahl zellulärer Aktivitäten moduliert wird (Caulfield 1993). Die Bildung des second messengers DAG löst eine Aktivierung der Isoenzyme der Proteinkinase C aus, die wiederum durch Phosphorylierung die Aktivitäten anderer Enzyme steuert (Caulfield 1993). Die vor allem durch die Subtypen M1, M3 und M5 hervorgerufene gesteigerte Aktivität der AC katalysiert die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus ATP. Das gebildete cAMP wirkt als second messenger und beeinflusst verschiedene Proteinkinasen und den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel und damit verschiedene intrazelluläre Reaktionskaskaden (Caulfield 1993).

2.2.3 Vorkommen und Wirkung muskarinischer Rezeptoren in der Trachea

Die spezifische Rolle der einzelnen Rezeptorsubtypen im respiratorischen Epithel ist nur unzureichend beschrieben. Von den genannten pharmakologischen Experimenten gibt es dafür einige Ansätze, der endgültige Beweis fehlt jedoch bisher. Eine große Schwierigkeit bereitet dabei die Tatsache, dass es bisher keine MR-Agonisten mit einer hohen Selektivität für jeden der 5 Subtypen gibt (Caulfield und Birdsall, 1998; Wess 2004). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit MR KO-Mäuse zur Erforschung der spezifischen Wirkung der einzelnen Subtypen eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.6 MR Knockout-Mäuse).

Die dominanten Rezeptoren in den Atemwegen der Maus sind die M1, M2 und M3 Rezeptorsubtypen (Fryer und el-Fakahany 1990; Barnes 1993; Garssen et al.

1993). Basbaum et al. (1984) markierten MR in den Atemwegen auf glatten Muskelzellen, Drüsenzellen und auf Epithelzellen. Dabei ist die Dichte der vorkommenden MR auf den glatten Muskelzellen größer als auf Drüsen- und Epithelzellen (Basbaum et al. 1984). Von den Epithelzellen besitzen die sekretorischen Zellen die gleiche Anzahl an MR pro Epitheloberfläche wie muköse Zellen (Basbaum et al. 1984). Bei den Zellen findet sich eine höhere Konzentration von Rezeptoren an der basolateralen Zellseite im Vergleich zur apikalen Zellseite (Basbaum et al. 1984). Auch die Verteilung der Rezeptoren in den Muskelzellen ist nicht einheitlich. Es finden sich 3-10x so viele Rezeptoren an der äußeren Muskelfaserschicht als in der inneren Muskelfaserschicht (Basbaum et al. 1984). Bei diesen Untersuchungen werden keine Angabe zur Verteilung der einzelnen Rezeptorsubtypen oder über das Vorkommen MR auf Nervenfasern gemacht. Dort sind die Rezeptorsubtypen unterschiedlich verteilt. In parasymphatischen Ganglien findet sich der exzitatorische M1 Rezeptorsubtyp, der dort die Erregungsübertragung moduliert (Barnes et al. 1993; Lee et al. 2001). Zusammen mit dem auf parasymphatischen Nerven postganglionär befindlichen inhibitorischen M2 Rezeptorsubtyp (Barnes et al. 1993; Lee et al. 2001) wird die ACh-Freisetzung aus den Nervenzellen moduliert (Lee et al. 2001). Die Aufgabe des M2 Rezeptors liegt dabei in der Inhibition der ACh-Freisetzung (Barnes et al. 1993). Insgesamt kontrollieren diese neuronalen Autorezeptoren mit den MR auf den Muskelzellen den ACh-vermittelten Tonus der Atemwege (Lee et al. 2001). Die Kontraktion der glatten Muskelzellen und damit die Bronchokonstriktion wird vorrangig über die M2 und M3 Rezeptorsubtypen moduliert (Barnes et al. 1993; Struckmann et al. 2003). Beide Rezeptoren fördern die Bronchokonstriktion (Barnes et al. 1993; Struckmann et al. 2003). Dabei kommt der M2 Rezeptorsubtyp in größerer Anzahl als der koexprimierte M3 Subtyp vor (Wess 2004). Obwohl in geringerer Anzahl vorkommend, gibt Wess (2004) die Schlüsselrolle in der Bronchokonstriktion dem M3 Rezeptor. In seinen Untersuchungen an MR defizienten Mäusen konnte er bei Fehlen des M3 Rezeptors eine um 40% verringerte Konstriktion der Trachea nachweisen. Einer Bronchokonstriktion wirkt laut Struckmann et al. (2003) der M1 Subtyp entgegen. In MR defizienten Tieren konnten Bymaster et al. (2003) aber bei Fehlen des M1 Rezeptors keine Veränderung in der Kontraktilität der glatten Muskelzellen

nachweisen. In M2 defizienten Tieren ist die Kontraktilität leicht und in M3 defizienten Tieren deutlich herabgesetzt.

Eine weitere Wirkung des M3 Rezeptores wird in der Stimulation von Drüsenzellen und Mukus-produzierende Zellen gesehen (Ramnarine et al. 1996; Rogers 2000; Coulson und Fryer, 2003). Dort aktiviert er vor allem die Mukusproduktion (Ramnarine et al. 1996), aber auch die Sekretion von Wasser und Elektrolyten (Coulson und Fryer, 2003). Neben dem M3 Subtyp enthalten Drüsenzellen den M1 Rezeptorsubtyp. Diesem wird ebenfalls eine Aktivierung der Sekretion zugesprochen, allerdings scheint er dabei keinen Einfluss auf die Mukus-Sekretion zu nehmen (Ramnarine et al. 1996), sondern für die Wasser- und Elektrolytsekretion verantwortlich zu sein (Coulson und Fryer, 2003). Den Einfluss der M1 und M3 Rezeptorsubtypen auf die Salivation bestätigen Bymaster et al. (2003) in Untersuchungen an MR defizienten Mäusen. Fehlt der M1 Rezeptor, ist die Salivation leicht und bei Fehlen des M3 Rezeptores deutlich erniedrigt.

Neben der Steigerung der Sekretion ist der M3 Rezeptor an der Erhöhung der ZSF im Trachealepithel beteiligt (Salathe et al. 1997; Salathe und Bookman 1999). Salathe et al. (1997) sehen in der Aktivierung/Hemmung des M3 Rezeptores eine Aktivierung bzw. Hemmung eines intrazellulären Signalweges, der über die Erhöhung/Erniedrigung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels die ZSF stimuliert/hemmt. Anhand pharmakologischer Experimente vermuten Yang und McCaffrey (1996) eine Beeinflussung der ZSF des Nasenepithels durch den M3 und den M1 Rezeptorsubtyp.

Eine ACh-induzierte Vasodilatation von Lungenarterien des Kaninchens und der Ratte wird vor allem über den M3 Rezeptorsubtyp vermittelt (Walch et al. 1999). In den Lungengefäßen des Menschen wird diese Dilatation laut Walch et al. (1999) neben dem M3 Subtyp zusätzlich durch den M1 Subtyp vermittelt.

Für die Modulation zellulärer Prozesse spielen MR eine große Rolle bei der Zellproliferation. Auf den Epithelzellen in der Ratte vorkommend, vermittelt der M1 Subtyp die Proliferation von Trachealepithelzellen (Metzen et al. 2003), während Matthiesen et al. (2006) an humanen Lungenfibroblasten eine Aktivierung vorrangig des M2 Rezeptors als Proliferationsstimulus ansehen.

2.2.4 Pathophysiologie der muskarinischen Rezeptoren

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind zahlreiche Atemwegserkrankungen beschrieben, bei denen dysfunktionale M2 Rezeptoren eine große Rolle spielen. So kommen funktionslose oder funktionseingeschränkte präsynaptische M2 Rezeptoren in Asthmapatienten und in Patienten mit chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD) (Lee et al. 2001; Coulson und Fryer, 2003), bei bestimmten Viruserkrankungen und im Tiermodell bei Ozoneinwirkung und bei Vitamin A Mangel vor (Coulson und Fryer, 2003). Die Anzahl und Funktion der M1 und M3 Rezeptoren auf glatten Muskelzellen, Drüsen und Blutgefäßen sind dabei unverändert und auch die Reaktion auf untersuchte M3 Agonisten zeigt keine Auffälligkeiten (Coulson und Fryer, 2003). Die Mechanismen, welche die dysfunktionalen M2 Rezeptoren bedingen, sind verschieden. Bei humanen Asthmapatienten ist der Mechanismus bisher unbekannt, vermutlich ist er aber vergleichbar mit dem bekannten Mechanismus in untersuchten Tiermodellen (Coulson und Fryer, 2003). Dort wird der Verlust der M2 Funktion über eosinophile Granulozyten vermittelt. Diese befinden sich in erkrankten Tieren als Cluster um die Ganglien der Atemwege und um die Nervenfasern (Coulson und Fryer, 2003). Dort inhibieren sie die M2 Rezeptoren mittels Freisetzung des „major basic protein“ (MBP) (Lee et al. 2001; Coulson und Fryer, 2003). Dieses Protein wirkt als endogener M2-Antagonist (Lee et al. 2001). Dysfunktionale M2 Rezeptoren finden sich bei Virusinfektionen mit Neuraminidase-besitzenden Viren wie Influenza- und Parainfluenzaviren (Jacoby und Fryer, 2001). Bei viralen Erkrankungen ist die Entstehung der dysfunktionalen M2 Rezeptoren außer in sensibilisierten Tieren unabhängig von eosinophilen Zellen (Coulson und Fryer, 2003). Vermutlich erfolgt der Funktionsverlust aufgrund einer Aktivierung von Entzündungszellen und der Freisetzung von Interferonen (Coulson und Fryer, 2003). Interferon γ erniedrigt die Expression der M2 Rezeptoren (Lee et al. 2001). Die Ozon-induzierte Dysfunktion des M2 Rezeptores wird – wie oben beschrieben - durch das MBP eosinophiler Zellen verursacht. Der Mechanismus über den ein Vitamin A Mangel den Funktionsverlust auslöst, ist bisher unbekannt (Coulson und Fryer, 2003).

Die Pathophysiologie des M1 Rezeptors ist bisher unklar und nicht genau beschrieben. Barnes (1993) beschreibt eine mögliche fördernde Einwirkung des

ganglionären M1 Rezeptores auf die Freisetzung von ACh. Wie oben beschrieben, ist die Freisetzung von ACh in chronischen Atemwegserkrankungen erhöht. So kommt nach Barnes (1993) eine Verschlimmerung von Asthma u. a. durch vermehrte Aktivität des M1-Rezeptores zustande. Bei diesen Erkrankungen kommt es weiterhin durch vermehrte Stimulation des M1 und M3 Rezeptors zu einer vermehrten Sekretion (Coulson und Fryer, 2003). Diese beiden Beispiele aber zeigen nur solche Erkrankungen, bei denen die Anzahl und Funktion des M1 Rezeptors (Coulson und Fryer, 2003) unverändert ist. Erkrankungen mit Veränderungen in der Anzahl oder Funktion des M1 Rezeptors sind bisher nicht bekannt. Eine ähnliche Situation findet sich bei der Beschreibung der Pathogenese des M3 Rezeptors. Auch ihm wird bei chronischen Erkrankungen eine gesteigerte Aktivität mit daraus folgender erhöhter Bronchokonstriktion und Sekretion zugesprochen (Coulson und Fryer, 2003). Die gesteigerte Aktivität resultiert - wie die gesteigerte Aktivität der M1 Rezeptoren - aus einer vermehrten ACh-Freisetzung aufgrund dysfunktionaler M2 Rezeptoren und nicht aus einer veränderten Funktion oder Anzahl der M3 Rezeptoren (Bymaster et al. 2003; Coulson und Fryer, 2003).

Eine erwähnenswerte Beteiligung der MR an pathophysiologischen Vorgängen über die Trachea hinaus ist ihr Einwirken beim kleinzelligen Lungenkarzinom. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Proliferations-fördernden Wirkung der MR, wird ihnen beim kleinzelligen Lungenkarzinom eine anti-proliferative Rolle zugewiesen (Williams 2003). Zusätzlich fördern sie bei dieser Erkrankung die Adhäsion der Krebszellen, was eine Reduzierung der Metastasenbildung zur Folge haben könnte (Quigley et al. 1998; Williams 2003). Eine besondere Bedeutung spielt dabei der M3 Rezeptorsubtyp, Quigley et al. (1998) aber sehen alle MR als möglichen Ansatzpunkt für die Entwicklung effektiver Behandlungsstrategien gegen diese Krebserkrankung.

2.2.5 Therapeutische Beeinflussung der muskarinischen Rezeptoren

Der Einsatz von Anticholinergika erfolgt bei chronischen Atemwegserkrankungen wie beispielsweise Asthma und COPD (Coulson und Fryer, 2003). Bei diesen Erkrankungen kommt es unter anderem aufgrund einer erhöhten Aktivität parasympathischer Nerven zu einer vermehrten ACh-Ausschüttung, welche über MR zu einem gesteigerten Bronchialmuskeltonus und einer Hypersekretion in den

Atemwegen führt (Coulson und Fryer, 2003). Bei der Pathogenese dieser Erkrankungen sind verschiedene MR-Subtypen beteiligt. Für die erhöhte ACh-Freisetzung werden dysfunktionale inhibitorische präjunktionale M2 Rezeptoren verantwortlich gemacht (Lee et al. 2001). Dies führt über eine vermehrte M3 Rezeptor Stimulation zu einer Bronchokonstriktion und über die Subtypen M1 und M3 zu einer vermehrten Sekretion (Lee et al. 2001). Laut Lee et al. (2001) begünstigt zusätzlich der exzitatorische M1-Rezeptor indirekt die Bronchokonstriktion, da er die Neurotransmission der cholinergen Ganglien begünstigt und zu einem gesteigerten cholinergen Tonus in den Atemwegen führen kann. Daraus ergeben sich für Lee et al. (2001) die Idealvorstellung in der Asthma- und COPD-Behandlung in einer Antagonisierung der M1 und M3 Rezeptoren, ohne Antagonisierung der M2 Rezeptoren. Mit dieser Therapie soll die Bronchokonstriktion gehemmt und die gesteigerte Sekretion vermindert werden. Der M2 Rezeptor soll nicht antagonisiert werden, um eine vermehrte ACh-Ausschüttung zu verhindern. Für die Zukunft sollte eine Therapie sogar einen M2 Rezeptorschutz oder eine gesteigerte M2 Expression erzielen (Lee et al. 2001). Bis zum heutigen Tag gibt es aber keine 100%ig selektiven Antagonisten. Die zuerst entwickelten Arzneimittel Atropin und Ipratropiumbromid blockieren mit gleicher Affinität den M1, den M2 und den M3 Subtyp und besitzen daher eine mangelnde Selektivität. Dies verhindert zwar einerseits eine vorrangig M3-vermittelte Bronchokonstriktion, fördert aber andererseits indirekt durch Blockierung des M2-Rezeptores die ACh-Freisetzung (Barnes 2004a). Ein Anticholinergikum mit Langzeitwirkung ist das Arzneimittel Tiotropiumbromid. Eine günstige Eigenschaft dieses Therapeutikums ist die unterschiedliche Dissoziation von den M1, M2 und M3 Rezeptorsubtypen und die lange Wirkungsdauer (Lee et al. 2001). Bindet Tiotropiumbromid nach Einnahme zunächst mit gleicher Affinität an die M1, M2 und M3-Rezeptoren, erfolgt die Dissoziation vom M2 Rezeptor relativ rasch (Halbwertszeit: 3,6 h). Die Dissoziation vom M1 Rezeptor findet als nächstes (Halbwertszeit 14,6 h) und die vom M3 noch wesentlich später statt (Halbwertszeit: 34,7 h) (Jacoby und Fryer 2001; Lee et al. 2001). Dies hat den Vorteil, dass nach anfänglich induzierter ACh Freisetzung – ein Ergebnis der M2 Blockade - die Blockade der Bronchokonstriktion durch länger andauernde M3 Antagonisierung in den

Vordergrund tritt. Dies bringt großen Nutzen bei Einsatz in Patienten mit COPD (Jacoby und Fryer 2001; Lee et al. 2001). M1 Antagonisten, wie Telenzepin und Pirenzepin, haben in Untersuchungen keinen signifikanten bronchodilatatorischen Effekt bei Asthma- und COPD-Patienten gezeigt (Lee et al. 2001). Ein neu entwickelter M1 und M3 Antagonist ist das Arzneimittel Revatropat, welches einen guten bronchodilatatorischen Effekt in COPD-Patienten zeigt, sich aber in Langzeitstudien erst noch bewähren muss (Lee et al. 2001). Mit Darifenacin und Zamifenacin sind zwei selektive M3 Antagonisten entwickelt worden. Diese zeigen eine höhere Affinität zur Bindung an M3 Rezeptoren der Speichel- und Submandibulardrüsen als an M3 Rezeptoren der Trachea, so dass ihr Einsatz vor allem in der Reduktion der Sekretproduktion gesehen wird (Lee et al. 2001).

Obwohl einige Virusinfektionen durch verschiedene Mechanismen die M2 Rezeptoren in den Atemwegen schädigen (Jacoby und Fryer 2001; Coulson und Fryer, 2003) und es zur einer vermehrten ACh-Freisetzung kommen kann, ist der Einsatz von Anticholinergika bei viralen Erkrankungen außer in Experimenten nicht beschrieben. Barnes (2004a) beschreibt einige Entzündungsmechanismen, die von verschiedenen MR vermittelt werden. Aber auch hier gibt es noch keinen Einsatz von Anticholinergika.

Der Einsatz von Cholinergika bei Erkrankungen des Atmungsapparates ist nicht beschrieben. Cholinergika werden vor allem bei bestimmten Augen-, Blasen- und Magen-Darm-Erkrankungen als Therapeutikum eingesetzt. Zur Diagnostik einer Hyperreagibilität der Lunge kann beispielsweise das Cholinergikum Methacholin eingesetzt werden (James und Ryan 1997; Piavaux et al. 2007).

2.2.6 Muskarinische Rezeptor Knockout-Mäuse

Ziel dieser Arbeit war es, die spezifische Rolle der bedeutenden M1-, M2- und M3- Rezeptorsubtypen zu erforschen. Da für die verschiedenen MR-Subtypen keine hoch selektiven Agonisten (Caulfield und Birdsall, 1998; Bymaster et al. 2003) und Antagonisten (Bymaster et al. 2003) zur Verfügung stehen und darüber hinaus die meisten Gewebe mehrere verschiedene Subtypen exprimieren (Wess 2004), war für eine erfolgreiche Austestung der spezifischen Rolle der MR-Subtypen der Einsatz sogenannter MR KO-Mäuse die Methode der Wahl. KO-Mäuse sind Tiere, denen ein ganz bestimmtes Gen gezielt ausgeschaltet wurde, um dessen Funktionen zu prüfen. Bei den MR KO-Mäusen gibt es die durch

gezieltes Ausschalten der m1-m5 MR-Gene Tiere, die defizient für jeweils einen der Rezeptorsubtypen sind (Bymaster et al. 2003). Die gezüchteten Mäuse sind lebensfähig, fertil (Bymaster et al. 2003; Wess 2004) und erscheinen im Allgemeinen gesund (Wess 2004). Darüber hinaus weisen die verschiedenen KO-Stämme keine großen Abweichungen in ihrem Phänotyp und in ihrem Verhalten auf (Wess 2004). In den Versuchen wurde stets der zum getesteten KO-Tier korrespondierende Wildtyp (WT) mit untersucht. Dieser bildet alle Rezeptorsubtypen aus. Der Vergleich einer gendefizienten Maus mit ihrem korrespondierenden WT-Stamm bringt Erkenntnisse über die spezifischen Wirkungen einzelner Subtypen. Durch das Fehlen der verschiedenen Rezeptorsubtypen wird in der KO Maus das Ausbleiben seiner spezifischen Wirkung erforscht.

2.3 Azetylcholin – neuronal und non-neuronal

Azetylcholin (ACh) ist ein Signalmolekül (Grando et al. 2003), welches unter Katalyse der Cholin-Azetyltransferase (ChAT) aus Cholin und Azetyl-Coenzym A synthetisiert wird (Starke et al. 1996). ACh wurde vor über 150 Jahren erstmals aus Gehirnen von Säugetieren isoliert (Grando et al. 2003). In seiner Arbeit von 1921 beschreibt Loewi das erste Mal das System der chemischen Neurotransmitter, und bereits fünf Jahre später identifizierten Loewi und Navratil ACh als die vom Vagusnerven freigesetzte Überträgersubstanz im Herzen (Loewi 1921). Seit dieser Zeit steht ACh für das klassische Beispiel eines Neurotransmitters (Wessler et al. 1998), der seine Wirkung über Freisetzung aus einem Neuron an der postsynaptischen Effektorzelle vermittelt (Wessler et al. 2003). In seiner wichtigen Funktion als Neurotransmitter wirkt ACh an allen präganglionären autonomen Neuronen, an postganglionär-parasympathischen Neuronen, an postganglionär-sympathischen Neuronen, die die Schweißdrüsen innervieren, sowie an allen Motoneuronen zur quergestreiften Muskulatur (Starke et al. 1996). Der Fokus der Forschung war bisher auf diese Neurotransmitterfunktion gerichtet (Wessler et al. 2003), welches aber nur einen sehr begrenzten Blickwinkel auf die gesamte biologische Bedeutung offenbart (Grando et al. 2003). ACh vermittelt seine Wirkung über nikotinische und muskarinische Rezeptoren, welche zusammen mit ChAT als das cholinerge System beschrieben werden (Wessler und Kirkpatrick, 2001a) Tatsächlich ist das

cholinerge System in der Natur seit mehr als 2,5 Milliarden Jahren entwickelt, weit vor der Entwicklung des Nervengewebes (Grando et al. 2003). ACh konnte bereits in Bakterien, Blau- und Grünalgen, Tubellarien, Pilzen, Protozoen und primitiven Pflanzen nachgewiesen werden (Sastry und Sadavongvivad 1978; Grando et al. 2003). In Pflanzen ist ACh dabei involviert in die Regulation von Wasserresorption und Photosynthese (Wessler et al. 2001b), so dass ACh seit ungefähr 3 Milliarden Jahren als Signalmolekül in nicht-neuronalen Geweben gesehen wird, wobei die neuronale Funktion mit einer Spanne von etwa einer halben Milliarden Jahre im Vergleich dazu erst relativ kurz ist (Grando et al. 2003). Bereits 1963 beschreibt Whittaker: „ACh kommt in nicht-nervalen Geweben vor und ist in der Natur derart weit verbreitet, dass ihm eine nicht-nervale Funktion zugesprochen werden kann“. Der Nachweis von nicht-nervalem ACh gelang erstmals Morris 1965 durch Nachweis des Syntheseeenzymes ChAT. Im weiteren Text wird zur Beschreibung von ACh als synaptischer Neurotransmitter der Begriff neuronales ACh (nACh) oder neuronales cholinerges System verwendet, abgegrenzt vom non-neuronalen ACh (nnACh) oder non-neuronalen cholinerges System bei der Beschreibung von ACh aus nicht-neuronalen Geweben.

2.3.1 Das non-neuronale cholinerge System in der Trachea

Im non-neuronalen cholinergen System wird ACh unabhängig von einer neuronalen Innervation von den verschiedensten Zellen synthetisiert und freigesetzt (Klapproth et al. 1997; Kawashima und Fujii, 2000), woraufhin es seine auto-, juxta- und parakrine Wirkung (Grando et al. 2003) vor allem als zelluläres Signalmolekül über nikotinische und muskarinische Rezeptoren vermittelt (Wessler et al. 2003). Wessler et al. (2003) beschreiben das non-neuronale cholinerge System als Basismodell des cholinergen Systems, welches sich nach Weiterentwicklung für die zusätzliche Rolle von ACh als Neurotransmitter in Struktur und Funktion von diesem neuronalen cholinergen System unterscheidet. In beiden Formen des cholinergen Systems wird ACh durch die ChAT synthetisiert (Wessler et al. 2003; Lips et al. 2005). Nach der Synthese wird ACh in Nervenzellen mit Hilfe des Vesikulären-Azetylcholin-Transporters (VACHT) in Vesikeln verpackt und gespeichert (Usdin et al. 1995). Ein Aktionspotenzial löst den komplexen Freisetzungsmechanismus des nACh aus.

Durch Zusammenspiel gelöster und membrangebundener Proteine werden die mit ACh gefüllten Vesikel an die Zellmembran gebracht und das ACh wird durch Exocytose der Vesikel freigesetzt (Wessler et al. 2003). Die Frage der Speicherung und Freisetzung von ACh im non-neuronalen cholinergen System ist noch nicht ganz geklärt. Non-neuronale Zellen besitzen laut Wessler et al. (2003) keine Vesikel als Speicherorganellen. Möglicherweise kann es im Zytosol gespeichert werden, möglicherweise wird es aber auch nach kontinuierlicher Synthese ohne Speicherung freigesetzt (Wessler et al. 2003). In Zelllinien des Bronchialepithels konnten Song et al. (2003) non-neuronales Vorkommen von VACHT nachweisen, welches Lips et al. (2005) durch Nachweis des Transporters in Becherzellen im Trachealepithel der Ratte ergänzen konnten. VACHT ist laut Lips et al. (2005) nicht in zilientragenden Zellen der Atemwege zu finden, so dass ein alternativer Freisetzungsmechanismus vorhanden sein muss. Diesen sehen Lips et al. (2005) in einer Freisetzung durch organische Kationentransporter (OCT). Von den drei vorhandenen Subtypen der OCT sind die Subtypen OCT 1 und 2 für die Freisetzung von ACh aus zilientragenden Zellen im Trachealepithel der Ratte verantwortlich (Lips et al. 2005). Im Trachealepithel der Maus konnten Kummer et al. (2006) die Freisetzung von nnACh ebenfalls durch OCT 1 und 2 nachweisen. Nach der Freisetzung vermittelt nACh seine Wirkung nach Diffusion durch den synaptischen Spalt schnell über eine große Menge an Rezeptoren, wie z. B. nikotinische Rezeptoren an der motorischen Endplatte. Sofort nach Bindung an die Rezeptoren wird ACh durch die äußerst aktive Cholinesterase abgebaut (Wessler et al. 2003). Eine hohe Konzentration von cholinergen Rezeptoren auf relativ kleiner Fläche, wie z.B. an der motorischen Endplatte, ist im non-neuronalen System bisher nicht bekannt (Wessler et al. 2003). Im Gegensatz zum neuronalen cholinergen System beschreiben Wessler et al. (2003) die Cholinesteraseaktivität im non-neuronalen System als gering.

2.3.2 Quellen von ACh in der Trachea

ACh in der Trachea kann einerseits von Nervenzellen (nACh) und andererseits von den verschiedensten non-neuronalen Zellen (nnACh) synthetisiert und freigesetzt werden. Neuronales ACh wird von parasympathischen Nervenfasern freigesetzt, die als wichtigste Effektorstrukturen in der Trachea die glatten Muskelfasern und die submukösen Drüsen innervieren (Wessler et al. 1998). Die

oberflächliche Epithelzellschicht in den Atemwegen des Menschen enthält keine cholinergen Nervenfasern (Wessler et al. 1998) und in der Maus laut Pack et al. (1984) überhaupt keine Nervenfasern. Laut Klapproth et al. (1997) kann nnACh in mehr oder weniger jeder menschlichen Zelle nachgewiesen werden. In der Trachea können ACh non-neuronalen Ursprunges bzw. Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems in zilientragenden Zellen (Wessler et al. 1998; Lips et al. 2005), in Basalzellen (Wessler et al. 1998), in sekretorischen und endokrinen Zellen (Song et al. 2003) nachgewiesen werden. Die Menge an nnACh im Trachealgewebe der Ratte geben Reinheimer et al. (1998a) mit 2.8 ± 0.5 (Mittelwert (MW) \pm SEM) nmol/g an. Um sicherzugehen, dass bei dieser Messungen kein nACh miteingeflossen ist, wurde abgeschabtes Trachealepithel untersucht, welches keine cholinergen Nervenfasern mehr enthält. Zwei Jahre zuvor gaben Reinheimer et al. (1996) die Menge von ACh in der Rattentrachea mit 25 nmol/g an. Diese Menge konnten sie um 50% reduzieren, wenn vor den Messungen die Mukosa entfernt wurde. In abgeschabtem Trachealepithel der Maus befindet sich ACh in einer Menge von $17,34 \pm 4,07$ (MW \pm SEM) pmol/mg (Kummer et al. 2006).

Zusätzlich zum Zellverband des respiratorischen Epithels kann nnACh in zahlreichen Immunzellen nachgewiesen werden, welche in die Mukosa oder Submukosa der Atemwege einwandern können. Als Beispiel werden Lymphozyten, Alveolarmakrophagen, Mastzellen und Granulozyten genannt (Fujii et al. 1996, 1998; Wessler und Kirkpatrick 2001a).

2.3.3 Funktionen von ACh in den Atemwegen – neuronal und non-neuronal

So weitgreifend die Verbreitung des non-neuronalen ACh ist, so zahlreich sind auch dessen Funktionen bei zellulären Prozessen. Non-neuronaales Azetylcholin aktiviert nikotinische und muskarinische Rezeptoren und kann so direkt an der freisetzenden Zelle (autokriner Effekt) oder an der Nachbarzelle (parakriner Effekt) wirken (Wessler et al. 1998). Weiterhin vermag zytosolisches ACh über intrazelluläre Rezeptoren zu agieren, von denen Wessler et al. (1998) als Beispiel die Proteine der Ras Familie nennen. Auch sehen Wessler et al. (1998) in der Aktivierung nukleärer muskarinischer Rezeptoren - bisher aber nur in der Hornhaut von Kaninchen nachgewiesen - eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung zellulärer Prozesse durch nnACh. In den Atemwegen ist nnACh

unter anderem beteiligt an der Aufrechterhaltung des intra- und extrazellulären Milieus (Steuerung der Sekretion und Absorption) (Wessler und Kirkpatrick, 2001a), der Proliferation von Bronchialepithelzellen (Klapproth et al. 1997) und Trachealepithelzellen (Metzen et al. 2003), der Ausbildung und Erhaltung der Zell-Zell-Kontakte (Nguyen et al. 2000) und des Zytoskeletts (Shafer et al. 1999) und an der Regulation der ZSF (Wessler et al. 1998). Schon 1954 beschreibt Burn einen Einfluss von ACh auf die ZSF und bezeichnet die Funktion von ACh als lokales Hormon, welches in niedrigen Konzentrationen den Transport von Graphitpartikeln auf einer aufgeschnittenen Kaninchentrachea beschleunigt, in hohen Konzentrationen aber zum gegenteiligen Effekt führt. Laut Wessler et al. (1998) kann das ACh Synthesenzym ChAT in hoher Konzentration innerhalb der zilientragenden Zelle zwischen dem intrazellulären Teil der Zilien und dem Basalkörper nachgewiesen werden, so dass auch sie den Einfluss von nnACh auf den Zilienschlag bestätigt.

Im Zellverband des respiratorischen Epithels moduliert Azetylcholin verschiedene Funktionen der unspezifischen und der spezifischen Immunabwehr (Wessler und Kirkpatrick, 2001a). So fördert nnACh die Freisetzung von Zytokinen (z.B. den Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierenden Faktor) (Klapproth et al. 1998), hemmt aber die Degranulation von Mastzellen (Reinheimer et al. 1997). In der Hemmung der Mastzelldegranulation sehen Wessler und Kirkpatrick (2001a) eine wichtige Beteiligung des nnACh in der Reduzierung mukosaler Entzündungen.

Von der Epidermis ist bekannt, dass ACh darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung spielt (Nguyen et al. 2001; Arredondo et al. 2002), wobei hierzu über die Atemwege keine Daten vorliegen.

Glatte Muskelzellen enthalten nnACh, wobei die biologische Funktion des muskulären nnACh bisher nicht ganz geklärt ist. Wessler und Kirkpatrick (2001a) beschreiben eine Beteiligung an phänotypischen Funktionen wie die Ausbildung des Zytoskeletts und der kontraktile Myosinfilamente. So könnte muskuläres nnACh an der Kontrolle der Weitstellung der Bronchien in den Atemwegen mitwirken (Wessler und Kirkpatrick, 2001a).

Neurales ACh wird von parasympathischen Nervenfasern freigesetzt, die als wichtigste Effektorstrukturen in der Trachea die glatten Muskelfasern und die

submuköse Drüsen innervieren (Wessler et al. 1998). An den Muskelfasern vermittelt ACh den Tonus der Atemwege (Lee et al. 2001) und regelt an den Drüsenzellen die Freisetzung verschiedenster Bestandteile des Trachealsekrets (Wanner et al. 1996; Coulson und Fryer, 2003).

Bei den meisten ACh-vermittelten Funktionen sind die beteiligten Rezeptortypen im Detail noch ungeklärt.

2.3.4 Pathophysiologie des non-neuronalen cholinergen Systems in den Atemwegen

Bis zum heutigen Tage sind die Kenntnisse über die Rolle des non-neuronalen cholinergen Systems bei Krankheiten oder Allergien der Atemwege ziemlich rar. Von Untersuchungen der Epidermis bei Patienten mit atopischer Dermatitis ist ein bis zu 15facher Anstieg von ACh in den betroffenen Hautstellen nachgewiesen (Reinheimer et al. 1998b). Zusätzlich erkranken Patienten mit atopischer Dermatitis häufig an bronchialem Asthma, welches den Verdacht einer Beteiligung des non-neuronalen cholinergen Systems aufkommen lässt. Untersuchungen der Wangenschleimhaut zeigen bei diesen Patienten ebenfalls eine erhöhte Menge an ACh, was den Verdacht erhärtet (Wessler und Kirkpatrick, 2001a). Versuchstiere, die mit Ovalbumin allergisiert wurden, zeigen eine erhöhte Menge an nnACh in den Atemwegen (Wessler et al. 2003). Dies konnte in Untersuchungen an gegen *Aternaria tenuis* allergisierten Kaninchen bestätigt werden (Wessler et al. 2003). Eine Erleichterung der Invasion von Mikroorganismen und Noxen sehen Wessler und Kirkpatrick (2001a) in einer gestörten Funktion des non-neuronalen Systems, als Folge eingeschränkter Zell-Zellkontakte, mangelndem Zilienschlag und herabgesetzter Sekretion.

Für die Zukunft ist die Rolle des non-neuronalen cholinergen Systems bei Krankheiten und Allergien genauer zu erforschen. Insbesondere im Hinblick auf die Tatsache, dass zur Behandlung chronischer Atemwegserkrankungen muskarinische Rezeptorantagonisten eingesetzt werden. Diese berücksichtigen nicht den Einfluss des (non-neuronalen) cholinergen Systems über die Aktivierung nikotinischer Rezeptoren (Wessler und Kirkpatrick, 2001a). Somit ist laut Wessler und Kirkpatrick (2001a) eine zukünftige Entwicklung von Arzneimitteln zur direkten Beeinflussung des non-neuronalen cholinergen Systems äußerst wichtig.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Bleiacetat	Merck KgaA	D 64271 Darmstadt
Kalziumchlorid- 2-hydrat	Merck KgaA	D 64271 Darmstadt
di-Natriumcarbonat	Merck KgaA	D 64271 Darmstadt
di-Natriumhydrogen- phosphat-2hydrat	Merck KgaA	D 64271 Darmstadt
Epon, Agar 100	Plano	D 35523 Wetzlar
Ethanol absolut	Riedel de Haën AG	D 30926 Seelze
Glucose	Merck KgaA	D 64271 Darmstadt
Glutardialdehyd	Merck KgaA	D 64271 Darmstadt
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co	D 76185 Karlsruhe
HEPES	Carl Roth GmbH & Co	D 76185 Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck KgaA	D 64271 Darmstadt
Magnesiumchlorid- 6-hydrat	Merck KgaA	D 64271 Darmstadt
Maleinsäure	Merck KgaA	D 64271 Darmstadt
Methylenblau	Merck KgaA	D 64271 Darmstadt
Natrium-3-citrat- 2-hydrat	Merck KgaA	D 64271 Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co	D 76185 Karlsruhe
Natriumdihydrogen- phosphat-2-hydrat	Riedel de Haën AG	D 30926 Seelze
Natriumhydrogencarbonat	Merck KgaA	D 64271 Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KgaA	D 64271 Darmstadt
Osmiumtetroxid	Sigma-Aldrich GmbH	D 89552 Steinheim
Paraformaldehyd	Riedel de Haën AG	D 30926 Seelze
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich GmbH	D 89552 Steinheim
Polyvinylpyrrolidon	Carl Roth GmbH & Co	D 76185 Karlsruhe
Procainhydrochlorid	Merck KgaA	D 64271 Darmstadt
Propylenoxid	Riedel de Haën AG	D 30926 Seelze
Saccharose	Sigma-Aldrich GmbH	D 89552 Steinheim

Thionin	Merck KgaA	D 64271 Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH	D 89552 Steinheim
Uranylacetat	Merck KgaA	D 64271 Darmstadt

3.1.2 Antikörper

Antigen	Wirtsspezies	Verdünnung	Bezugsquelle
PGP 9.5	Kaninchen polyklonal	1:10000	Biotrend, D 50876 Köln
Villin	Kaninchen polyklonal	1:6400	Prof. D. Drenckhahn, Anatomisches Institut, D 97070 Würzburg

Tab. 5: In der Immunhistochemie verwendete Primärintensoren

Antigen	Wirtsspezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen-Ig	Esel	1:2000	Chemicon, Temecula, CA 92590, USA

Tab. 6: In der Immunhistochemie verwendeter Sekundärintikörper

3.1.3 Weitere eingesetzte Substanzen

3.1.3.1 Pharmaka

Adenosintriphosphat	Sigma-Aldrich GmbH	D89552 Steinheim
Atropin	RBI	Natick, MA 01760, USA
Heparin 5000	Ratiopharm GmbH	D 89079 Ulm
Isofluran	Abbott GmbH & Co. KG	D 65011 Wiesbaden
Muskarin	Sigma-Aldrich GmbH	D 89552 Steinheim

3.1.3.2 Seren

bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich GmbH	D89552 Steinheim
Pferdeserum	Schlachthof/Giessen	

3.1.4 Puffer und Lösungen

Gepuffertes Glycerol, pH 8,6

50 ml 0,5 M Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)
mit 0,5 M Dinatriumcarbonat (Na_2CO_3) auf pH 8,6 einstellen.
Ein Teil dieser Pufferlösung mit zwei Teilen Glycerol mischen

Hepes-Ringer-Puffer, pH 7,4

0,418 g Kaliumchlorid (KCl)
7,97 g Natriumchlorid (NaCl)
1,96 g Glucose
2,38 g HEPES
1,0 ml einer 1 mM Magnesiumchlorid-6-hydratlösung ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)
2,2 ml einer 2,2 mM Kalziumchlorid-2-hydratlösung ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) mischen und
ad 1000 ml aqua dest auffüllen, auf pH 7,4 einstellen

Histoblocklösung

10% Pferdeserum
0,5% Tween 20
0,1% bovines Serumalbumin

Maleatstammlösung 0,02 M

23,2 g Maleinsäure
200 ml 1 N Natronlauge (NaOH)
ad 1000 ml aqua dest

Maleatpuffer 0,05 M

50 ml Maleatstammlösung (0,02 M)
14 ml NaOH

ad 200 ml aqua dest, auf pH 5,2 einstellen

2% Paraformaldehydlösung mit 1,5% Glutardialdehyd in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4

20 g Paraformaldehyd

ad 500 ml aqua dest, Lösung auf 70 °C erhitzen.

einige Tropfen 0,2 M NaOH bis Lösung klar wird dazugeben

500 ml 0,2 M Phosphatpuffer, auf pH 7,4 einstellen, Lösung durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm filtrieren

60 ml Glutardialdehyd (25%ig) kurz vor Perfusion hinzugeben

4%ige Paraformaldehydlösung in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4

40 g Paraformaldehyd

ad 500 ml aqua dest, Lösung auf 70 °C erhitzen.

einige Tropfen 0,2 M NaOH bis Lösung klar wird dazugeben

500 ml 0,2 M Phosphatpuffer, auf pH 7,4 einstellen, Lösung durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm filtrieren

Phosphatpuffer 0,2 M, pH 7,4

Lösungen für Pufferansatz herstellen:

1) 31,2 g 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) ad 1 l aqua dest

2) 35,6 g/l 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) ad 1 l aqua dest

Herstellen des Phosphatpuffers aus 230 ml Lösung 1) und 770 ml Lösung 2) einstellen auf pH 7,4

Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4

Lösungen für Pufferansatz herstellen:

- 1) 31,2 g/l 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ad 1 l aqua dest
- 2) 35,6 g/l 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ad 1 l aqua dest

Herstellen des Phosphatpuffers aus 230 ml Lösung 1) und 770 ml Lösung 2), dazu 1000 ml aqua dest, einstellen auf pH 7,4

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Lösungen für Pufferansatz herstellen:

- 1) 31,2 g/l 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 2) 35,6 g/l 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Herstellen der phosphatgepufferten Salzlösung aus 28,75 ml Lösung 1) und 96,20 ml

Lösung 2)

dazu 22,4 g NaCl

ad 5000 ml aqua dest

PBS mit doppeltem NaCl-Gehalt

Lösungen für Pufferansatz herstellen:

- 1) 31,2 g/l 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 2) 35,6 g/l 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Herstellen der phosphatgepufferten Salzlösung aus 28,75 ml Lösung 1) und 96,20 ml

Lösung 2)

dazu 44,8 g NaCl

ad 5000 ml aqua dest

Reynoldsreagenz

1,33 g Bleiacetat
 1,76 g Na-3-citrat-2-hydrat
 ad 30 ml aqua dest,
 8 ml 1 N NaOH
 ad 50 ml aqua dest

Rüdebergfärbung

0,1 g Methylenblau
 0,1 g Thionin
 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 ad 100 ml aqua dest

Vorspüllösung, pH 7,4

25 g Polyvinylpyrrolidon (PVP, Massengewicht [MG] 40000)
 9 g NaCl
 5 g Procainhydrochlorid
 ad 1000 ml aqua dest,
 einstellen der Lösung auf pH 7,4

3.1.5 Geräte und Laborbedarf

3.1.5.1 Zellzählung

Eukitt	Fluka Chemie AG	CH 95471 Buchs
200 nm Filter	Nalgene Company	Rochester, NY 14625, USA
Flacheinbettungsform	eigene Herstellung	
Trimmmaschine TM60	Reichert	D 80995 München
Histodiamant	Drukker International B.V.	5431 SH Cuijk, NL
Kamera CCD Axio Cam	Carl Zeiss AG	D 37081 Göttingen
Mikroskop Axioplan 2 Imaging mot	Carl Zeiss AG	D 37081 Göttingen

Mikroskop BX 60	Olympus GmbH	D 20097 Hamburg
Objektiv PlanApo 60x/1,40	Olympus GmbH	D 20097 Hamburg
Objektiv PlanApochromat 100x/1,4 NA	Carl Zeiss AG	D 37081 Göttingen

3.1.5.2 Transmissionselektronenmikroskopie

bis zur Anfertigung der Semidünnschnitte Geräte wie bei Zellzählung

Ultradiamantmesser	Diatom,, Leica Vertrieb GmbH	D 70374 Stuttgart
Grids Maxtaform-Netzchen 200 mesh Cu/Rh	Plano	D 35523 Wetzlar
Transmissionselektronenmikroskop LEO 906	Carl Zeiss AG	D 37081 Göttingen
Transmissionselektronenmikroskop EM 902	Carl Zeiss AG	D 37081 Göttingen
Film Kodak Ectagrafik HC	Kodak GmbH	D 70327 Stuttgart
Film Kodak Technical Pan	Kodak GmbH	D 70327 Stuttgart
Film Macophot Ort 25c	Hans O. Mahn & CoKG	D 22145 Stapelfeld

3.1.5.3 Immunhistochemie

Kamera CCD Axio Cam	Carl Zeiss AG	D 37081 Göttingen
Kryostat CM 1900	Leica Microsystems GmbH	D 35578 Wetzlar
Mikroskop Axioplan 2 imaging	Carl Zeiss AG	D 37081 Göttingen
Objektiv Plan-Neofluar 5x/0,15	Carl Zeiss AG	D 37081 Göttingen
Objektiv Plan-Apochromat 40x/0,95	Carl Zeiss AG	D 37081 Göttingen
Objektträger SuperFrost Plus	Gerhard Menzel GmbH&CoKG	D 38116 Braunschweig
Software: Axio Vision	Carl Zeiss Vision GmbH	D 37081 Göttingen
Tissue-Tek	Sakura Finetek Inc.	Torrance, CA 90501 USA

3.1.5.4 Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG)

Delta T Kulturschälchen 0,17 mm Bodendicke, klar	Bioptechs	Butler, PA 16002,USA
Dynabeads	Dynal Biotech	N 0309 Oslo
Minutien	Insektenbedarf	D 76307 Karlsbad
Mikroskop BX 50WI	Olympus GmbH	D 20097 Hamburg
Objektiv UMPlanFl 20x/0.50W	Olympus GmbH	D 20097 Hamburg
Kamera Imago CCD	T.I.L.L. Photonics GmbH	D 82166 Gräfelfing
Sylgard 184	Dow Corning GmbH	D 65201 Wiesbaden
Software: Tillvision	T.I.L.L. Photonics GmbH	D 82166 Gräfelfing

3.1.5.5 Messung der Zilienschlagfrequenz (ZSF)

Dynabeads	Dynal Biotech	N 0309 Oslo
Geräte bis zur Messung am Mikroskop: siehe Methode der Messung der Partikeltransportmessung		
Kamera EHDCmos 1.3M-Ex	EHD-Imaging GmbH	D 49401 Damme
Objektiv LUM PlanFl 40x/0.80 W Japan	Olympus GmbH	D 20097 Hamburg
Sylgard 184	Dow Corning GmbH	D 65201 Wiesbaden
Software: SMX View Version	Sumix Corporation	3403 Southwood, CA
92054 Tillvision	T.I.L.L. Photonics GmbH	D 82166 Gräfelfing
AutoSignal	SeaSolve Software Inc.	Chicago, IL 60606, USA

3.1.5.6 Qualitative Untersuchung der Zilienschlagtransportrichtung

Geräte bis Filmaufnahme am Mikroskop: siehe Methode der Zilienschlagfrequenzmessung		
Dynabeads	Dynal Biotech	N 0309 Oslo
Objektiv UM PlanFl 10x/0.30 W Japan	Olympus GmbH	D 20097 Hamburg
Software: SMX View Version	Sumix Corporation	3403 Southwood, CA 92054

3.2 Methoden

3.2.1 Zellzählung

3.2.1.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden MR-KO Mäuse, die jeweils einen oder zwei Rezeptorsubtypen nicht ausbilden, und deren korrespondierende WT-Stämme verwendet (siehe Tab.7).

KO-Stämme	Korrespondierende WT-Mäuse	Genetischer Hintergrund
M1KO	M1M3WT	129 SvEv (50%) x CF1 (50%)
M2KO	M2WT	129 J1 (50%) x CF1 (50%)
M3KO	M1M3WT	129 SvEv (50%) x CF1 (50%)

Tab. 7: Verwendete KO-Mäuse und deren korrespondierende WT-Mäuse mit Angaben des genetischen Hintergrundes

Von den verwendeten Mäusen wurden von jedem Stamm 5 adulte Tiere weiblichen Geschlechts durch eine Überdosis Isofluran getötet.

3.2.1.2 Probengewinnung

Perfusionsfixierung

Der Thorax wurde eröffnet und das Herz freigelegt. In das Herz wurden 0,5 ml Heparin injiziert. Anschließend wurde der rechte Vorhof eingeschnitten und durch den linken Ventrikel eine Kanüle in die Aorta geschoben und mit Hilfe einer Klemme in Position gehalten. Das Blut wurde mit Vorspüllösung aus dem Kreislauf gewaschen. Im Anschluss wurde das Tier mit gepufferter 2%iger Paraformaldehydlösung mit 1,5% Glutardialdehyd perfundiert.

Gewebeentnahme

Von der freipräparierten Trachea wurde ein ca. 3 mm langes Stück direkt kaudal des Kehlkopfes (im weiteren Text: zervikaler Trachealabschnitt) und ein ca. 3 mm langes Stück direkt kranial der Bifurkation tracheae (im weiteren Text: thorakaler Trachealabschnitt) entnommen.

3.2.1.3 Probenvorbereitung

Einbettung in Epon

Nach der Probenentnahme wurden die Proben eine Stunde im Fixans belassen und anschließend mehrere Stunden im 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Die Proben wurden danach eine Stunde bei Raumtemperatur in 0,5% Osmiumtetroxid in aqua dest inkubiert. Direkt nach der Osmierung wurden die Proben 3x für mindestens 15 min in 0,05 M Maleatpuffer gewaschen und mit 1% Uranylacetat in Maleatpuffer bei Raumtemperatur in völliger Dunkelheit für eine Stunde kontrastiert. Um eine Ablagerung von Uranylkristallen auf den Proben zu vermeiden, wurde die Uranylacetatlösung zuvor durch einen 200 nm Filter gepresst. Nach einer gründlichen Waschung der Proben in Maleatpuffer erfolgte die anschließende Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die Alkoholreihe beinhaltete eine Entwässerung für 15 min bei 30-, 50-, 70-, 80-, 90-, 96% Alkohol, für 30 min bei 100% Alkohol und für 15 min in einem 1:1 Gemisch aus 100% Alkohol und Propylenoxid. Nach der Alkoholreihe wurden die Proben zuerst einmal für 15 min in reines Propylenoxid und danach für 30 min in ein 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und Epon gelegt. Die Einbettung in reines Epon erfolgte in einer Flacheinbettungsform aus Silikonkautschuk, in denen das Epon für 2 Tage bei 60°C auspolymerisierte.

Anfertigung von Semidünnschnitten

Die auspolymerisierten Eponblöckchen wurden an einer schmalen Seite mit dem Diamantschleifer einer Trimmmaschine pyramidenförmig zurechtgeschliffen, um eine geeignete Schnittgröße der Blöckchen zu erhalten. Das Schneiden der Semidünnschnitte auf eine Dicke von 0,75 µm erfolgte mit einem Histodiamanten. Dabei wurde darauf geachtet, dass der ganze Querschnitt der Trachea mit

vollständigem Erhalt des Epithels auf einem Schnitt zu sehen war. Die Schnitte wurden auf mit 1% Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger gebracht und bei 60°C auf einer Heizplatte getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min mit Rüdeberg-Lösung gefärbt. Die Schnitte wurden danach mit Eukitt beschichtet und eingedeckelt.

Auswertung am Mikroskop

Die Zellen wurden mit Durchlicht unter dem Mikroskop Olympus BX 60 mit einem 60x Ölobjektiv ausgezählt. Bei der Auszählung wurden die lichtmikroskopisch sichtbaren zilientragenden Zellen, nicht-zilientragenden Zellen und Basalzellen voneinander unterschieden. Diese Zellen wurden einmal im zervikalen Teil der Trachea und einmal im thorakalen Teil der Trachea ausgezählt. Es wurden nur Zellen mit angeschnittenem Zellkern gezählt.

Zur weiteren Unterscheidung wurde die Zusammensetzung des Epithels über den Knorpelspangen (im weiteren Text: cartilaginäres Areal oder Knorpelteil), die Zusammensetzung des Epithels über dem Trachealmuskel (im weiteren Text: muskuläres Areal oder Muskelteil) und die Zusammensetzung des Epithels über den Trachealbändern (im weiteren Text: ligamentäre Areale oder Bandteil) getrennt voneinander berücksichtigt. Zur Auswertung der relativen Häufigkeit der verschiedenen Zelltypen wurden für jeden Trachealabschnitt und für jedes Areal 200 Zellen ausgezählt.

Für den statistischen Vergleich der relativen Häufigkeit wurden drei Fragestellungen berücksichtigt:

- **Vergleich 1:** Relative Häufigkeit zilientragender Zellen, nicht-zilientragender Zellen und Basalzellen bei den KO-Mäusen im Vergleich zu ihren korrespondierenden WT-Stämmen
- **Vergleich 2:** Relative Häufigkeit zilientragender Zellen, nicht-zilientragender Zellen und Basalzellen innerhalb eines Stammes im Vergleich zervikaler Trachealabschnitt zu thorakalem Trachealabschnitt bei gleichem Areal

- **Vergleich 3:** Relative Häufigkeit zilientrager Zellen, nicht-zilientrager Zellen und Basalzellen innerhalb eines Stammes im gleichen Teilstück der Trachea im Vergleich der unterschiedlichen Areale zueinander

Die Aufnahmen zu Demonstrationszwecken wurden am Mikroskop Axioplan 2 imaging mit dem 60x Objektiv angefertigt.

3.2.1.4 Zellzahlauswertung

Für die Zellzählung des Epithels über dem Knorpel-, Muskel- und dem Bandteil der Trachea wurden pro Lage des Epithels 200 Zellen ausgezählt.

Die 200 Zellen wurden einer bestimmten Auszähltechnik (20 einzelne Zehnerpäckchen) unterzogen, um in einem Makro den kleinsten zulässigen Stichprobenumfang für stereologische Messungen an histologischen Schnitten zu berechnen (Baur 1969).

3.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie

3.2.2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden die MR KO-Mäuse und deren korrespondierende WT-Mäuse aus gleicher Herkunft wie in der Methode der Zellzählung verwendet (siehe Tab. 7).

Von den verwendeten Mäusen wurden von jedem Stamm 5 adulte Tiere weiblichen Geschlechts durch eine Überdosis Isofluran getötet.

3.2.2.2 Probengewinnung

erfolgte wie bei der Methode der Zellzählung

3.2.2.3 Probenvorbereitung

Einbettung in Epon

erfolgte wie bei der Methode der Zellzählung

Anfertigung von Ultradünnschnitten

Die auspolymerisierten Eponblöckchen wurden an einer schmalen Seite mit dem Diamantschleifer einer Trimmmaschine pyramidenförmig zurechtgeschliffen, um eine geeignete Schnittgröße der Blöckchen zu erhalten. Das Schneiden der Semidünnschnitte auf eine Dicke von 0,75 µm erfolgte mit einem Histodiamanten. Die Schnitte wurden mit Methylenblau gefärbt und anschließend unter einem Lichtmikroskop Olympus BX 60 beurteilt. Nur Schnitte, die einen kompletten Querschnitt der Trachea zeigten, wurden zur elektronenmikroskopischen Auswertung weiter bearbeitet. Dazu wurden von den Blöckchen 80 nm dicke Ultradünnschnitte mit einem Ultradiamantmesser angefertigt. Die Schnitte wurden auf 200 mesh Cu/Rh grids aufgezogen. Zur Nachkontrastierung wurden die Schnitte mit einer gesättigten Uranylacetatlösung überzogen und für 20 bis 30 min in völliger Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte vorsichtig mit ausreichend aqua dest gespült, um überschüssiges Uranylacetat zu entfernen. Anschließend fand eine fünfminütige Inkubation mit Reynoldsreagenz statt. Zum Schluss wurden die Schnitte gründlich mit aqua dest gespült und getrocknet.

3.2.2.4 Bildaufnahme

Die Bilder wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop LEO 906 und mit dem Transmissionselektronenmikroskop EM 906 angefertigt. Es wurden Filme von Kodak (Kodak Ectagrafik HC und Kodak Technical Pan) und Macophot (Macophot Ort 25c) verwendet. Die Bilder wurden mit verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen. Die Belichtungszeit betrug 1s.

Es wurden folgende morphologischen Kriterien untersucht:

- Vorhandensein verschiedener Zelltypen. Es wurden zilientragende Zellen (ZZ), Basalzellen (BZ) und bei den nicht-zilientragenden Zellen (NZ) sekretorische, endokrine und Bürstenzellen unterschieden.
- qualitative Beurteilung der Zell-Zellkontakte mit Unterscheidung der Zell-Zellkontakte zwischen ZZ, zwischen NZ und zwischen ZZ und NZ
- qualitative Beurteilung der Zilienmorphologie

3.2.3 Immunhistochemie

3.2.3.1 Versuchstiere

Zu Durchführung dieser und aller folgenden Methoden wurden neue Rückkreuzungen der Stämme der MR KO-Mäuse eingesetzt (siehe Tab.8). Zu all diesen KO-Stämmen gehört der korrespondierende WT-Stamm C57/B6Ntac. Nach der tabellarischen Darstellung wird im weiteren Text zur Vereinfachung weiterhin die Bezeichnung M1KO, M2KO und M3KO für die verschiedenen KO-Stämme und WT für den korrespondierenden C57/B6Ntac-Stamm verwendet.

KO-Maus	Korresp. WT-Stamm	Genetischer Hintergrund
M1KO	C57/B6Ntac	129 SvEv (50%) x CF1 (50%)
M2KO	C57/B6Ntac	129 J1 (50%) x CF1 (50%)
M3KO	C57/B6Ntac	129 SvEv (50%) x CF1 (50%)

Tab. 8: Verwendete KO-Mäuse und deren korrespondierende WT-Stamm mit Angaben des genetischen Hintergrundes

Von den verwendeten Mäusen wurden von jedem Stamm 5 adulte Tiere weiblichen Geschlechts durch eine Überdosis Isofluran getötet.

3.2.3.2 Probengewinnung

Perfusionsfixierung

Der Thorax wurde eröffnet und das Herz freigelegt. In das Herz wurden 0,5 ml Heparin injiziert. Anschließend wurde der rechte Vorhof eingeschnitten und durch den linken Ventrikel eine Kanüle in die Aorta geschoben und mit einer Klemme in Position gehalten. Das Blut wurde mit Vorspüllösung aus dem Kreislauf gewaschen. Im Anschluss wurde das Tier mit 4%iger Paraformaldehydlösung perfundiert und somit fixiert.

Präparation und Gewebeentnahme

erfolgte wie bei der Methode der Zellzählung

Gewebeasservierung

Nach der Entnahme wurden die Proben noch eine Stunde im Fixans gelassen und anschließend zur Entfernung des Fixans über mehrere Stunden mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Zur Kryoprotektion wurden die Proben über Nacht in 18% Saccharose in Phosphatpuffer gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die Einbettung der Proben in Tissue-Tek und das Einfrieren in flüssigem Stickstoff.

Herstellung von Gefrierschnitten

Zehn µm dicke Schnitte wurden quer zur Längsachse der Tracheen mit dem Kryostat Modell CM 1900 hergestellt und auf SuperFrost Plus Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden sie für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.

Immunhistochemische Markierung

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Gewebeschnitte mit Histoblocklösung überschichtet und, um eine Austrocknung zu vermeiden, in einer feuchten Kammer für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die eingesetzten Primärantikörper gegen PGP 9.5 und Villin (siehe Tab. 5) mit PBS verdünnt und in der feuchten Kammer über die Präparate gegeben. Nun folgte eine Inkubationsphase von mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurden die Präparate zur Entfernung überschüssiger Primärantikörper zweimalig vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation der Schnitte mit den zu einer Gebrauchskonzentration mittels PBS 2xNaCl-Puffer verdünntem Sekundärserum dk- α -rb Immunglobulin Cy 3 II [dk (Esel) = Wirtsspezies, rb (Kaninchen), Cy 3 II = Farbstoff] (Tab. 6). Die Inkubation fand bei völliger Dunkelheit statt. Nach der

Inkubation wurden die Schnitte zur Entfernung überschüssiger Sekundärantikörper zweimalig vorsichtig mit PBS gewaschen und danach für 10 min in 4% Paraformaldehyd nachfixiert. Zum Entfernen des Paraformaldehyds wurden die Proben dreimalig mit PBS gewaschen und zum Abschluss mit gepuffertem Glycerol eingedeckelt:

3.2.3.3 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Zellzählung

Die Präparate wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und mit Hilfe einer Kamera in 40facher Vergrößerung fotografiert und mittels des Programmes Axiovision auf einem PC dargestellt. An diesem Bild wurden die markierten Zellen ausgezählt.

Bei den Aufnahmen wurde darauf geachtet, dass zur späteren Zellzählung nur solche Präparate verwendet wurden, die ein komplett erhaltenes Trachealepithel über den gesamten Trachealquerschnitt aufwiesen. Gezählt wurden die durch den PGP 9.5 Antikörper markierten endokrinen Zellen sowie die durch den Villin Antikörper markierten mikrovillitragenden Bürstenzellen. Zusätzlich zur Zellzählung wurde vom Trachealquerschnitt eine Aufnahme in 5facher Vergrößerung angefertigt. An dieser Vergrößerung wurde mit Hilfe einer gezeichneten Markierungslinie der Umfang des Trachealquerschnittes in Bildpunkten bestimmt. Die Größe des Trachealquerschnittes der WT-Mäuse wurde einmal für den zervikalen und einmal für den thorakalen Trachealabschnitt gemittelt und als Standardquerschnitt festgesetzt. Alle ausgezählten Zellen der WT- und der KO-Tiere wurden auf den entsprechenden Standardquerschnitt bezogen und statistisch ausgewertet.

3.2.4 Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit in der Trachea

3.2.4.1 Versuchstiere

Für die Vorversuche wurden FVB-Mäuse und C57/B6Ntac-WT-Mäuse verwendet. Jedes Vorversuchsprotokoll wurde an 3 adulten Tieren eines Stammes getestet. Es wurden männliche und weibliche Tiere verwendet. Die Mäuse wurden durch eine Überdosis Isofluran getötet.

Für die Versuche wurden folgende MR KO-Mäuse und deren korrespondierenden WT-Mäuse verwendet:

KO-Maus	Korresp. WT-Mäuse	Genetischer Hintergrund
M1KO	C57/B6Ntac	129 SvEv (50%) x CF1 (50%)
M2KO	C57/B6Ntac	129 J1 (50%) x CF1 (50%)
M3KO	C57/B6Ntac	129 SvEv (50%) x CF1 (50%)
M2/M3KO	M2/M3WT	129 J1 (25%) x 129 SvEv (25%) x CF1 (50%)

Tab. 9: Verwendete KO-Mäuse und deren korrespondierende WT-Mäuse mit Angaben des genetischen Hintergrundes

Von jedem Stamm wurden 6 adulte Tiere beiderlei Geschlechts durch eine Überdosis Isofluran getötet.

3.2.4.2 Organentnahme

Die Freilegung der Trachea erfolgte durch Eröffnung der Thoraxhöhle durch Schnitt in der Medianebene, weiterführend an der ventralen Halsseite bis zum Kehlkopfbereich. Danach wurde die Trachea von Fettgewebe, Blutgefäßen und anhaftendem Oesophagus frei präpariert und mittels einer Schere einmal direkt caudal des Kehlkopfes und einmal direkt cranial der Bifurkation abgetrennt. Direkt nach Entnahme wurde die Trachea in ein mit kaltem (4-8°C) Hepes-Ringer Puffer gefülltes Delta T Kulturschälchen gelegt. In die verwendeten Schälchen wurde zuvor ca. 1,5 ml Sylgard, ein klares Silikonelastomer, ausgegossen, welches bei einer Temperatur von 60°C auspolymerisierte.

3.2.4.3 Vorbereitung zur Messung

Die Trachea wurde mit 2-3 Minuten in natürlicher Streckung mit dem M. trachealis nach oben aufgespannt.

Anschließend wurde der M. trachealis der Länge nach aufgeschnitten und der kalte Hepes-Ringer Puffer gegen 1,5 ml auf 37°C vorgewärmten Hepes-Ringer Puffer ausgetauscht. Das Schälchen wurde in einen Halter mit integriertem

Heizsystem unter das Mikroskop Olympus BX50WI gespannt und mit einem 20x Eintauchobjektiv betrachtet. Durch einen Temperaturfühler seitlich am Haltesystem konnte über die gesamte Versuchsdauer die Temperatur des Mediums kontrolliert werden. Bei diesen Versuchen betrug sie die gesamte Versuchsdauer hindurch konstante 30°C. Nun wurden 2 µl Polystyrenkügelchen, sogenannte Dynabeads, in das Medium seitlich der Trachea hinein pipettiert und vorsichtig mit Hilfe einer Pipette im Medium verteilt. In den verwendeten 2 µl Dynabeads befinden sich ca. 600000 Polystyrenkügelchen mit einem Durchmesser von etwa 4,5 µm.

3.2.4.4 Messung

Für die Messung des Partikeltransportes wurde mit dem Mikroskop eine Region zwischen zwei Knorpelspangen aufgesucht und für die Aufnahmen der Dynabeads eine Fokusebene möglichst nahe der Zilien gewählt.

Die Aufnahmen wurden bei Durchlicht mit einer Kamera Imago CCD angefertigt. Die Auflösung des CCD-Chip betrug 1280 x 960 Bildpunkte. Bei diesen Versuchen wurden zu gewählten Messpunkten (siehe Protokolle) 200 Bilder pro Film angefertigt. Dabei betrug die Belichtungszeit 20 ms und die Zeit zwischen zwei Aufnahmen 85 ms, dies entsprach einer Frequenz von 11,78 Bildern pro Sekunde. Zur Steuerung der Aufnahmen wurde das Programm Tillvision verwendet.

Die Zugabe einer Substanz erfolgte in gelöster Form mit einer Pipette seitlich der Trachea in das Medium. Anschließend wurde sie vorsichtig mit dem Medium vermischt. Die zugegebenen Volumina lagen im Bereich von 1,5 µl bis 15 µl.

Muskarin und ATP wurden in einer Konzentration von 10^{-4} M (ATP 10^{-4} M = 100 µM), Atropin in einer Konzentration von 10^{-6} M eingesetzt.

3.2.4.5 Protokolle

Für alle Protokolle der Vorversuche und der Versuche galt:

- Messbeginn 0 = 30 min nach Tod des Tieres
- Zeitangaben erfolgt in min
- jede Zeitangabe stellt einen Messpunkt dar

Vorversuche

Die Vorversuche wurden zur Etablierung des Messsystems durchgeführt. Zunächst wurde die PTG ohne Substanzzugabe über eine Dauer von 1 Stunde gemessen, um Aussagen über die Vitalität der Trachea in diesem System bis 1,5 Stunden nach Entnahme aus dem Tier treffen zu können (Abb. 1). Die Zugabe von ATP, mit seiner Aufgabe als Stimulans der ZSF und somit der PTG, diente einerseits zur Demonstration der Messbarkeit einer Steigerung der PTG, andererseits zur Vitalitätsüberprüfung der Trachea bei WT- und KO-Tieren (Abb. 1+2). Weiterhin wurde in den Vorversuchen die Wirkkonzentration der später in den Versuchen eingesetzten Substanzen getestet. Es wurde die Muskarinkonzentration gesucht, die eine effektive Steigerung der PTG bewirkte (Abb.3).

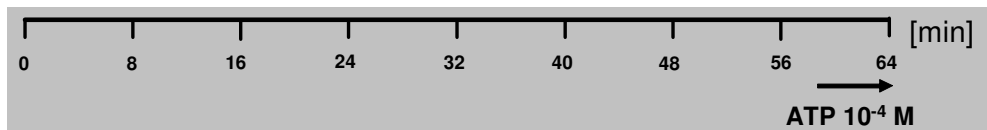


Abb. 1: Versuchsprotokoll der Vitalitätsüberprüfung der Trachea

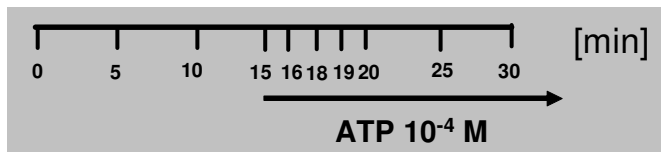


Abb. 2: Versuchsprotokoll über die Zugabe von ATP

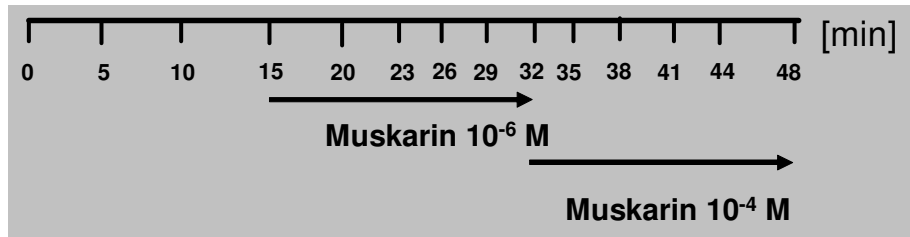


Abb. 3: Versuchsprotokoll zur Austestung der Muskarinkonzentration

Versuche

Der Einfluss einzelner muskarinischer Rezeptoren auf die PTG wurde in den Versuchen getestet. Dazu wurden der Agonist muskarinischer Rezeptoren Muskarin (Abb. 4) und der muskarinische Antagonist Atropin (Abb. 5) eingesetzt. Die Muskarinwirkung wurde über einen Zeitraum von 15 min gemessen. Zur statistischen Auswertung wurden einmal die PTG 8 min nach Muskarinzugabe - entsprechend der Muskarinwirkung zur Hälfte der Versuchsdauer - und einmal die maximale PTG unter Muskarineinwirkung verwendet. Die abschließende Gabe von ATP als Stimulans der PTG diente zur Überprüfung der Vitalität der Trachea. Zur statistischen Auswertung der ATP-Wirkung wurde die maximale PTG nach ATP-Zugabe bei den eingesetzten WT-Stämmen getestet.

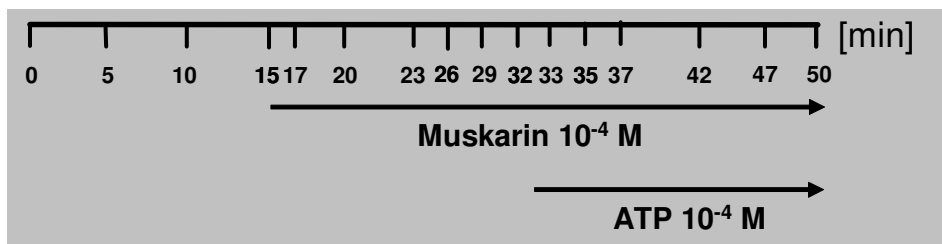


Abb. 4: Versuchsprotokoll über die Zugabe von Muskarin und ATP

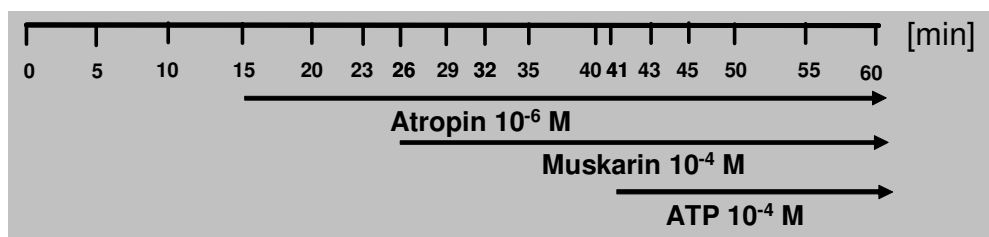


Abb. 5: Versuchsprotokoll über die Zugabe von Atropin, Muskarin und ATP

3.2.4.6 Auswertung:

Die Auswertung ist am Beispiel einer MIKO-Maus dargestellt (siehe Abb. 6).

Die Auswertung und Berechnung der Durchschnittsgeschwindigkeit der transportierten Partikel wurde im ersten Teil durch das Programm Tillvision ausgeführt. Zuerst erfolgte die Aufnahme der Oberfläche des Trachealepithels bei Durchlicht mit allen transportierten Partikeln. Zur Auswertung wurde elektronisch

von allen Bildern eines Filmes ein Durchschnittsbild berechnet. Anschließend wurde das Durchschnittsbild von allen vorliegenden Bildern eines Filmes automatisch abgezogen, um nicht veränderliche Teile des Bildes von sich bewegendenden Teilen abzugrenzen. Jetzt wurden die Bilder kopiert und die vorher 12 Bit Originalbilder automatisch auf 8 Bit umgerechnet. Für die Kopie wurde manuell ein Schwellenwert gesetzt, um ein binäres Bild zu erhalten. In diesem binären Bild erscheinen die sichtbaren Partikel weiß und der Hintergrund schwarz. Nun wurden ebenfalls diese Bilder auf 8 Bit umgerechnet und für beide 8 Bit Bilder ein Tracking-Algorithmus durchgeführt. Bei den durchgeführten Versuchen wurden folgende Einstellungen für den Tracking-Algorithmus vorgegeben: für die maximale Pixeldistanz der Wert 50 pixel und für die maximale Beschleunigung der Wert 20 pixel/frame². Die maximale Pixeldistanz beschreibt die Entfernung, die ein Partikel im Vergleich von einem zum folgenden Bild zurückgelegt haben kann, um in die Berechnung mit aufgenommen zu werden. Der Wert der maximalen Beschleunigung beschreibt die Beschleunigung, die ein Partikel in zwei aufeinander folgenden Bildern aufweisen darf, um ebenfalls in die Berechnung mit aufgenommen zu werden.

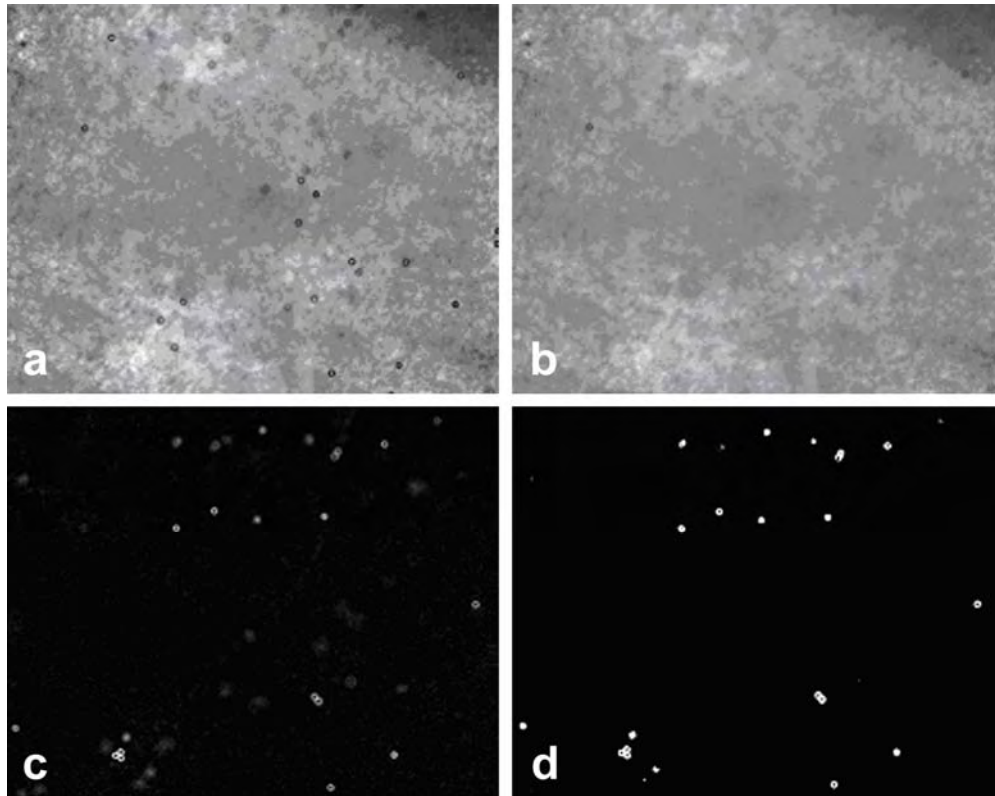


Abb. 6: Darstellung der Bildverarbeitung zur Messung der PTG

- a) Aufnahme eines Filmes bei Durchlicht. Zu sehen ist die Oberfläche des Trachealepithels mit den transportierten Dynabeads.
- b) Dargestellt ist das elektronisch errechnete Durchschnittsbild aller Bilder eines Filmes.
- c) Dargestellt ist das automatisch errechnete Differenzbild. Dies entsteht, nachdem das zuvor erstellte Durchschnittsbild von allen Bildern eines Filmes abgezogen wurde.
- d) Dargestellt ist ein Bild nach gesetztem Schwellenwert. Sichtbare Partikel erscheinen weiß und der Hintergrund schwarz.

Für die weitere Auswertung wurden pro Messpunkt die Tracks der Partikel ausgewählt, die in 10 aufeinander folgenden Bildern sichtbar waren, und der Median bzw. der Mittelwert der Durchschnittsgeschwindigkeit ermittelt. Die Anzahl von 10 aufeinander folgenden Bildern wurde gewählt, da bei dieser Einstellung ausreichend Partikel (50 bis 300 Partikel) vorhanden waren und trotzdem Partikel mit einer sehr kurzen Wegstrecke aussortiert wurden. Zusätzlich zur bisherigen Auswertung wurde die Auswertung nur mit Partikeln wiederholt, deren gemessener Weg nicht mehr als 15% länger war als die Strecke zwischen ihrem Start- und ihrem Endpunkt. Dies ermöglicht den Ausschluss von sich im Kreis drehenden Partikeln (siehe Abb. 7).

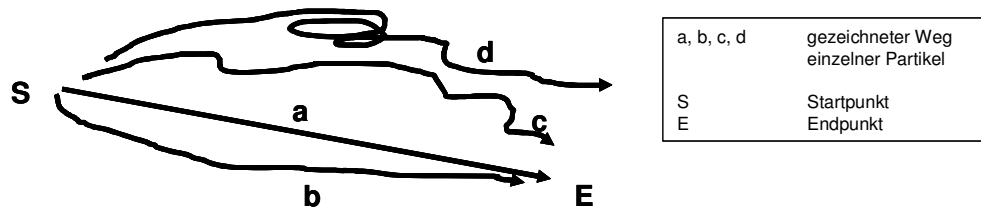


Abb. 7: Gezeichnete Wegstrecke verschiedener Partikel zur Darstellung eines Auswertekriteriums
Partikel a und b werden in die Auswertung mit einbezogen. Bei Partikel c und d weicht der gemessene Weg >15% von der Strecke Start/ Ende ab, daher keine Auswertung

Abschließend wurden die Werte in ein Diagramm eingefügt, in dem die Durchschnittsgeschwindigkeit der transportierten Partikel gegen die Zeit nach Entnahme der Trachea dargestellt wurde. Die Einheit der Geschwindigkeit der Partikel wird in vom Programm vorgegebenen Einheiten berechnet. Zur Errechnung der Geschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ muss die Geschwindigkeit in PC-Einheit mit einem für jedes Objektiv kalkulierten Faktor berechnet werden. Der Faktor zur Umrechnung beträgt für das 20iger Objektiv $\times 0,0073885$.

3.2.5 Bestimmung der Zilienschlagfrequenz

3.2.5.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden MR KO-Mäuse und deren korrespondierende WT-Mäuse wie zur Methode der Bestimmung der PTG verwendet (siehe Tab. 9)

Von den verwendeten Mäusen wurden von jedem Stamm 4 adulte Tiere beiderlei Geschlechts durch eine Überdosis Isofluran getötet.

3.2.5.2 Organentnahme

Siehe Methode der Bestimmung der PTG

3.2.5.3 Vorbereitung zur Messung

Die Vorbereitung zur Messung incl. der Zugabe der Pharmaka erfolgte wie unter der Methode der Bestimmung der PTG. Die Aufnahmen erfolgten mit dem 40x Eintauchobjektiv.

3.2.5.4 Messung

Für die Aufnahmen wurde ein Bildausschnitt gewählt, auf dem möglichst gleichmäßig verteilte zilienträgende Zellen zu sehen waren. Während der gesamten Versuchsdauer wurde die einmal ausgewählte Region beibehalten.

Die Aufnahmen wurden bei Durchlicht mit einer Kamera EHD CMOS 1.3M angefertigt. Die Auflösung des Chips betrug 1280 x 786 Bildpunkte. Das Darstellungsfeld betrug 640 x 480 Bildpunkte. Bei diesen Versuchen wurden zu gewählten Zeitpunkten (siehe Protokolle Abb. 8) 1000 Bilder pro Film angefertigt. Dabei betrug die Belichtungszeit 7,71 ms und die Zeit zwischen den Fotos 9,52 ms, welches einer Frequenz von 105 Bildern pro Sekunde entspricht. Ausgeführt wurden die Aufnahmen mit dem Steuerprogramm der Kamera SMX View Version.

Die Zugabe der Substanzen erfolgte wie unter der Methode der Messung der PTG (Abb. 8).

3.2.5.5 Protokoll

Für das Versuchsprotokoll galt:

- Messbeginn 0 = 30 min nach Tod des Tieres
- Zeitangaben erfolgt in min
- jede Zeitangabe stellt einen Messpunkt dar

Versuche

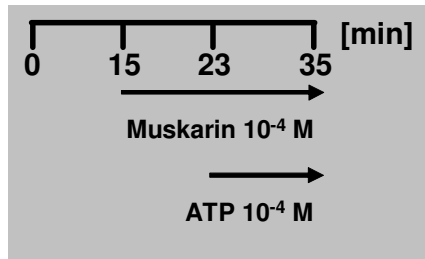


Abb. 8: Versuchsprotokoll über die Zugabe von Muskarin gefolgt von ATP

3.2.5.6 Auswertung:

Die Auswertung ist am Beispiel einer C57/B6Ntac Maus dargestellt (siehe Abb. 9).

Die Auswertung und Berechnung der ZSF wurde mit Hilfe der Programme SMX View Version, Tillvision und AutoSignal ausgeführt. Zuerst erfolgten Durchlichtaufnahmen der Oberfläche des Trachealepithels mit den zilientragenden Zellen. Auf dem Startbild des Filmes wurden für jeden Versuch von zehn verschiedenen, willkürlich ausgewählten, zilientragenden Zellen eine sogenannte „region of interest“ umgrenzt. Innerhalb dieser Regionen wurde für die 1000 Bilder einer Filmsequenz der Mittelgrauwert berechnet. Die daraus resultierende Kurve wurde anschließend mit Hilfe einer Fast Fourier Transformation umgerechnet. Die aus der Transformation errechnete dominante Frequenz wurde als ZSF dieser Zelle zum jeweiligen Messpunkt betrachtet. Die Frequenz der ausgewählten zehn zilientragenden Zellen wurde für jeden Messzeitpunkt gemittelt und in einem Diagramm dargestellt.

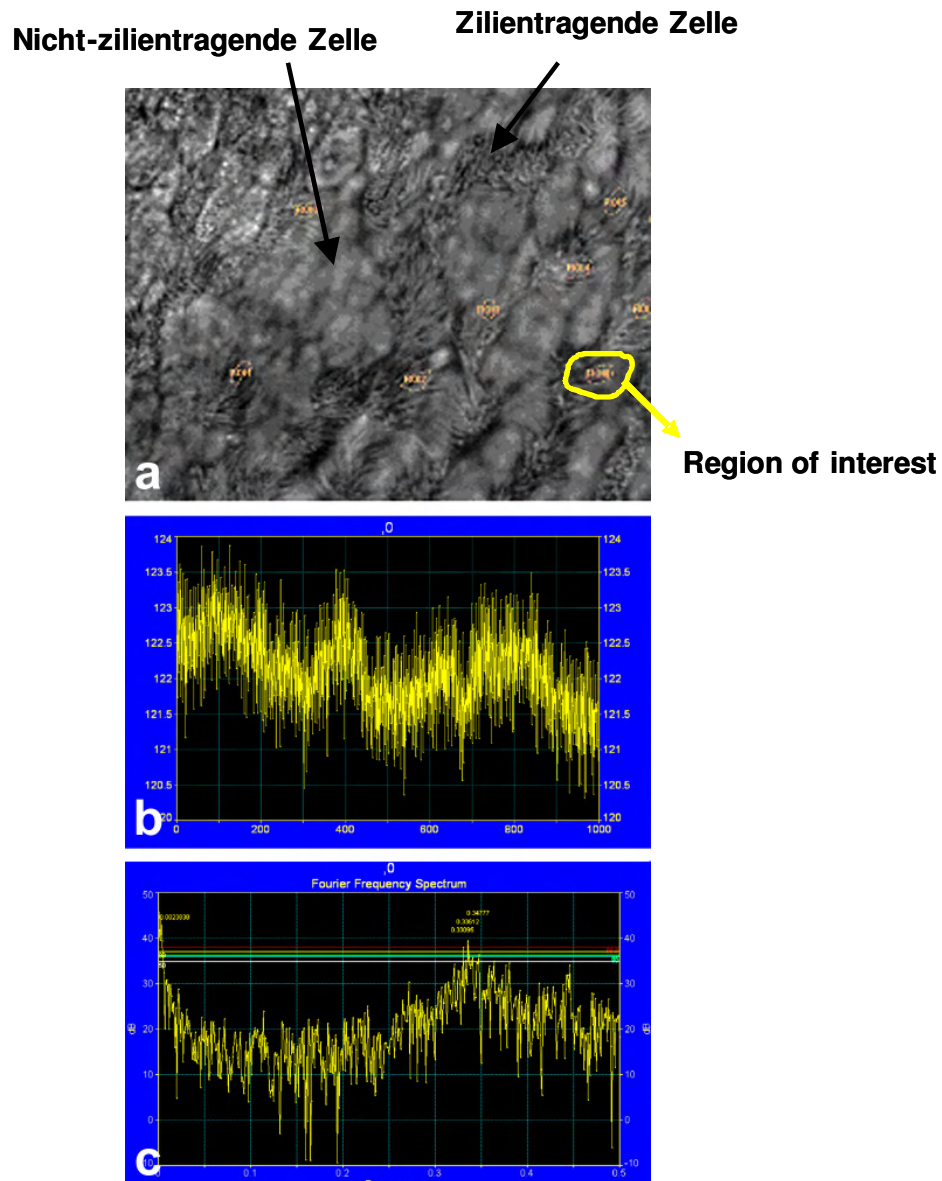


Abb. 9: Bildverarbeitung zur Messung der ZSF

- a) Dargestellt ist ein Einzelbild mit zehn willkürlich ausgewählten zilientragenden Zellen, in denen eine sogenannte „region of interest“ umgrenzt wurde. Innerhalb dieser Region wird für jedes Bild einer Sequenz der Mittelgrauwert berechnet.
- b) Darstellung der Mittelgrauwerte für jedes der 1000 Bilder eines Filmes am Beispiel der oben gelb markierten region of interest. Die daraus resultierende Kurve wurde anschließend mit Hilfe einer Fast Fourier Transformation umgerechnet.
- c) Nach Anwendung einer Fast Fourier Transformation wurde die errechnete dominante Frequenz als ZSF für diese Zelle zum jeweiligen Messpunkt betrachtet.

3.2.6 Untersuchung zur Richtung des Partikeltransportes

3.2.6.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden folgende MR KO-Mäuse und deren korrespondierenden WT-Mäuse verwendet (siehe Tab.10).

KO-Maus	Korresp. WT-Maus
M1KO	C57/B6Ntac
M3KO	C57/B6Ntac
M2M3KO	M2M3WT

Tab. 10: Verwendete KO-Mäuse und deren korrespondierende WT-Mäuse

Genetischer Hintergrund der Mäuse: siehe Methode Immunhistochemie und Messung der PTG. Von den verwendeten Mäusen wurden von jedem Stamm 6 adulte Tiere beiderlei Geschlechts durch eine Überdosis Isofluran getötet.

3.2.6.2 Organentnahme

Siehe Methode Messung der PTG

3.2.6.3 Vorbereitung zur Aufnahme

Die Ziele waren einerseits Beobachtungen der Richtung der transportierten Partikel über die gesamte Trachea, andererseits Beobachtungen der Zilienschlagrichtung einzelner zilientragenden Zellen. Für die Übersichtsaufnahmen wurde das 10x Eintauchobjektiv und für die Zilienschlagaufnahmen einer einzelnen Zelle wurde das 40x Eintauchobjektiv verwendet. Bei diesen Versuchen wurden Dynabeads mit einem Durchmesser von 2,8 µm eingesetzt.

Die Trachea wurde wie zur Methode der Messung PTG vorbereitet.

3.2.6.4 Aufnahmen

Für die Übersichtsaufnahmen wurde die Partikeltransportrichtung über die gesamte Länge der Trachea betrachtet. Auffällige Veränderungen der Transportrichtung wurden mit dem Programm SMX View dokumentiert. Dabei wurde pro Veränderung ein 20 Sekunden langer Film mit 27 Bilder/s mit einer Auflösung von 1280 x 1024 Bildpunkten angefertigt. Als auffällige Veränderungen wurden abrupte Transportrichtungsänderungen einzelner Partikel zum restlichen Partikelstrom oder Wirbelbildungen der Partikel gewertet. Um eine quantitative Aussage treffen zu können, wurden die Anzahl der Transportrichtungsänderungen pro Trachea angegeben. Für die Dokumentation der Schlagrichtung einzelner zilienträgenden Zellen wurden die Aufnahmen mittels des oben genannten Programmes durchgeführt.

3.2.7 Statistik

Für die statistische Auswertung der Experimente sowie deren graphische Darstellung wurde das Programm SPSS (Version 11,0) von SPSS Inc. Headquarters Chicago Illinois verwendet.

Die Ergebnisse wurden einer explorativen Datenanalyse unterzogen. Für verbundene Stichproben innerhalb eines Mäusestammes wurde der Wilcoxon-Test verwandt. Für unverbundene Paare zwischen verschiedenen Mäusestämmen wurde zuerst der Kruskal-Wallis Test und anschließend der Mann-Whitney U Test eingesetzt. Beobachtete Differenzen wurden bei $p \leq 0,05$ als signifikant und bei $p \leq 0,01$ als hochsignifikant eingestuft. Die Ergebnisse wurden als Boxplots mit den Minimum-, Maximum- und Medianwerten sowie den Perzentilen 25 und 75 dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Morphologische Befunde

Es wurde die relative Häufigkeit der verschiedenen Zelltypen im Epithel über dem Knorpel-, dem Muskel- und dem Bandteil der Trachea in den KO-Stämmen und den korrespondierenden WT-Stämmen untersucht (Abb. 10-12).

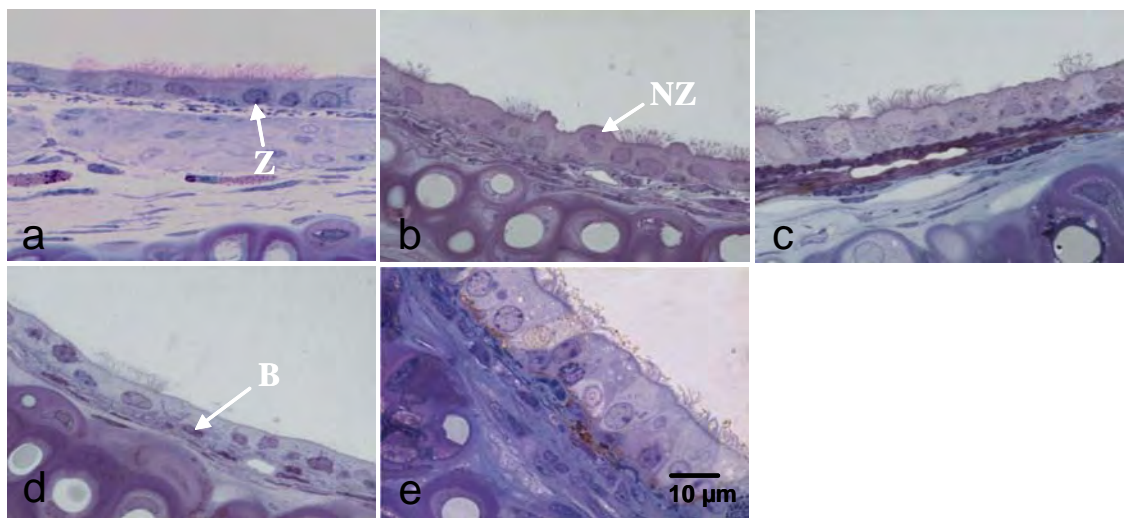


Abb. 10: Verschiedene Zelltypen im Epithel über dem Knorpelteil der Trachea

Z = zilientragende Zelle, NZ = nicht-zilientragende Zelle, B = Basalzelle

- a) Trachealepithel in einer M1M3WT-Maus
- b) Trachealepithel in einer M1KO-Maus
- c) Trachealepithel in einer M3KO-Maus
- d) Trachealepithel in einer M2WT-Maus
- e) Trachealepithel in einer M2KO-Maus

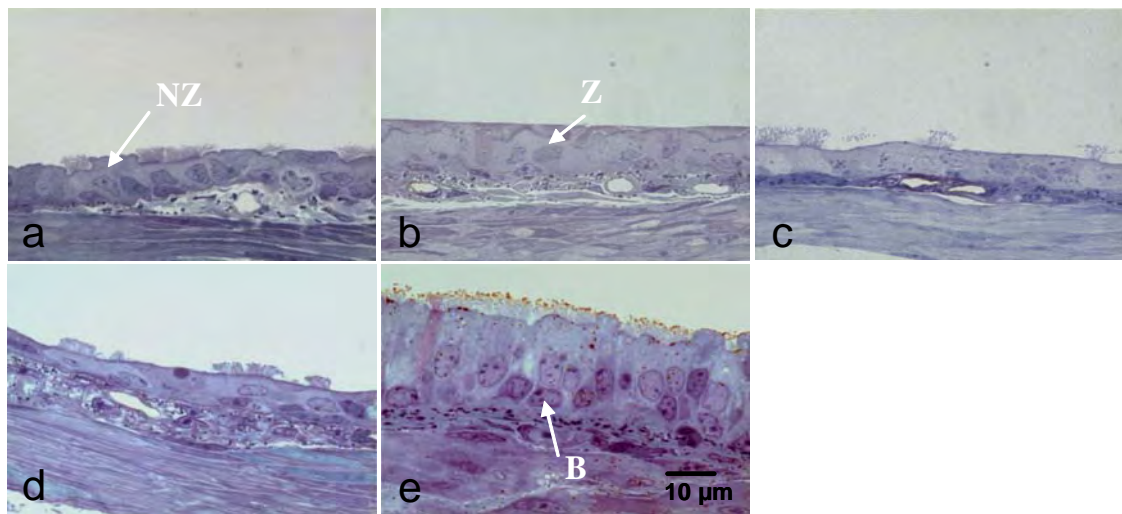


Abb. 11: Verschiedene Zelltypen im Epithel über dem Muskelteil der Trachea

Z = zilientragende Zelle, NZ = nicht-zilientragende Zelle, B = Basalzelle

- a) Trachealepithel in einer M1M3WT-Maus
- b) Trachealepithel in einer M1KO-Maus
- c) Trachealepithel in einer M3KO-Maus
- d) Trachealepithel in einer M2WT-Maus
- e) Trachealepithel in einer M2KO-Maus

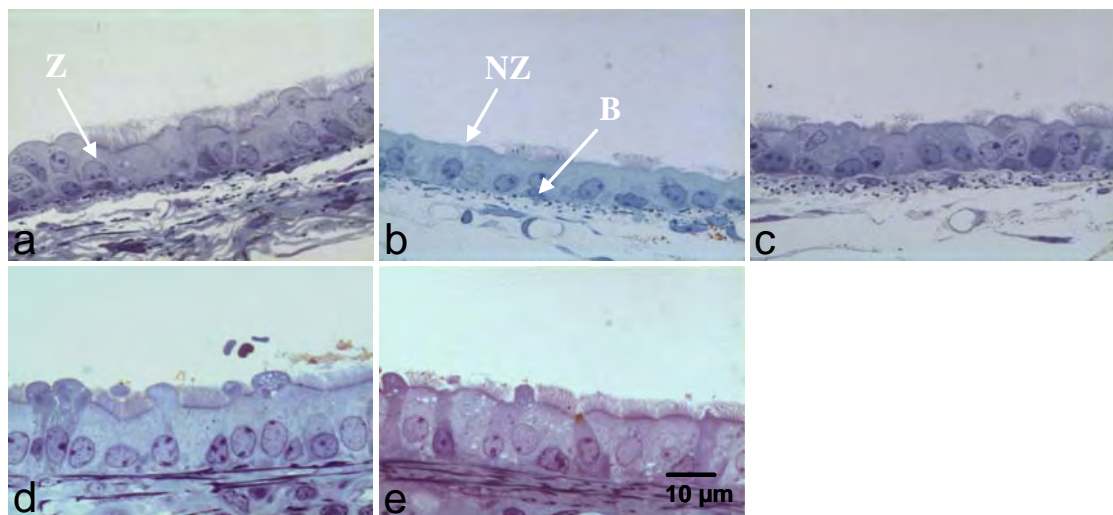


Abb. 12: Verschiedene Zelltypen im Epithel über dem Bandteil der Trachea

Z = zilientragende Zelle, NZ = nichtzilientragende Zelle, B = Basalzelle

- a) Trachealepithel in einer M1M3WT-Maus
- b) Trachealepithel in einer M1KO-Maus
- c) Trachealepithel in einer M3KO-Maus
- d) Trachealepithel in einer M2WT-Maus
- e) Trachealepithel in einer M2KO-Maus

4.1.1 Relative Häufigkeit zilientragender Zellen, nicht-zilientragender Zellen und Basalzellen im Trachealepithel im Vergleich MR KO-Mäuse zu ihren korrespondierenden WT-Stämmen

Die relative Häufigkeit der einzelnen Zelltypen unterschieden sich nicht signifikant zwischen den untersuchten KO-Stämmen und deren korrespondierenden WT-Stämmen (Tab. 11 und Abb. 13).

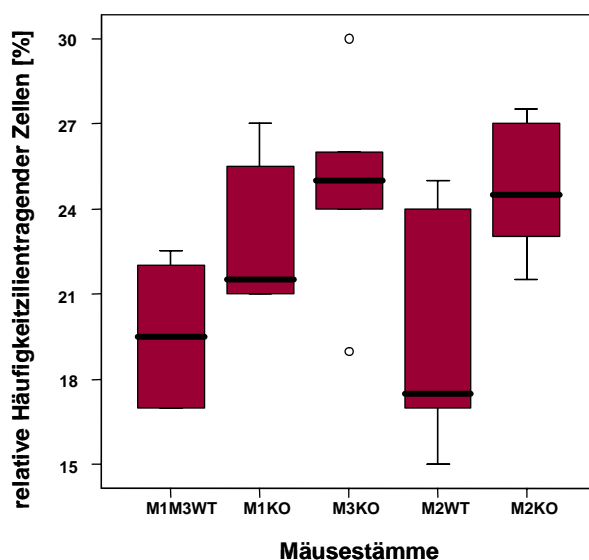


Abb. 13: Die Boxplots illustrieren die relative Häufigkeit der einzelnen Zelltypen im laryngealen Trachealabschnitt in den untersuchten KO-Stämmen und in den korrespondierenden WT-Stämmen.

Die Boxplots zeigen die 0, 25, 50, 75 und 100 Perzentile

° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung

4.1.2 Relative Häufigkeit zilientragender Zellen, nicht-zilientragender Zellen und Basalzellen im Trachealepithel im Vergleich zervikaler Trachealabschnitt zu thorakalem Trachealabschnitt

Der Vergleich des zervikalen mit dem thorakalen Trachealabschnitt zeigte keinen signifikanten Unterschied in der relativen Häufigkeit der einzelnen Zelltypen (Tab. 11 und Abb. 14) bei allen untersuchten Mäusestämmen.

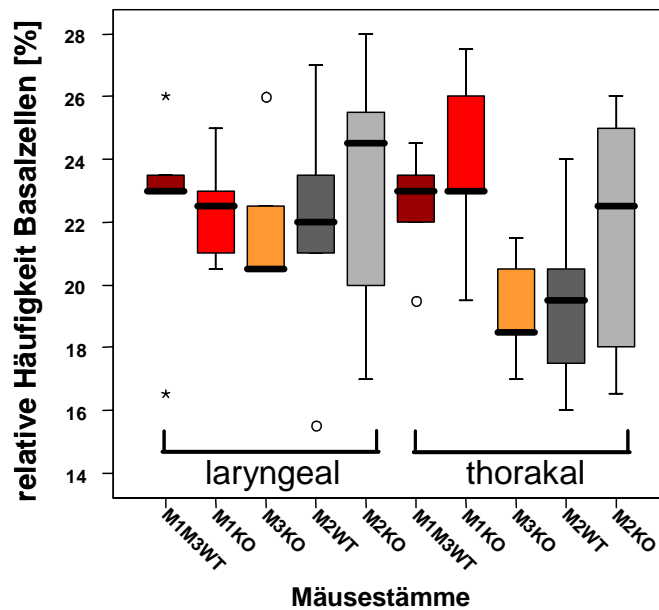


Abb. 14: Die Boxplots illustrieren die relative Häufigkeit der Basalzellen im Vergleich laryngealen zu thorakalem Trachealabschnitt in den untersuchten KO-Stämmen und in den korrespondierenden WT-Stämmen. Die Boxplots zeigen die 0, 25, 50, 75 und 100 Perzentile.

° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung

4.1.3 Relative Häufigkeit zilientragender Zellen, nicht-zilientragender Zellen und Basalzellen im Trachealepithel im Vergleich der cartilaginären, muskulären und ligamentären Arealen zueinander

4.1.3.1 Zilientragende Zellen

Die relative Häufigkeit zilientragender Zellen war im cartilaginären Areal sowohl im zervikalen als auch im thorakalen Trachealabschnitt gegenüber dem muskulären und ligamentären Areal in allen Stämmen signifikant erniedrigt.

Keinen signifikanten Unterschied erbrachte der Vergleich zilientragender Zellen zwischen den muskulären und ligamentären Arealen der Trachea (Tab. 11 und Abb. 15)

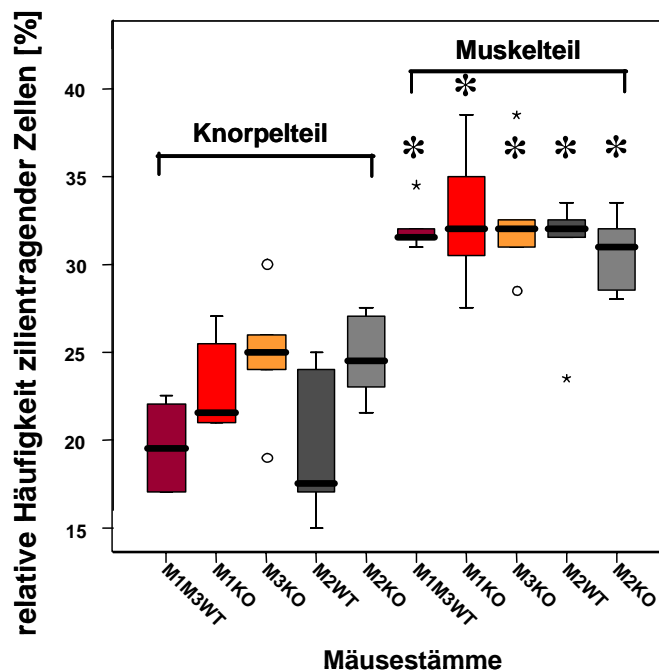


Abb. 15: Die Boxplots illustrieren die relative Häufigkeit zilientragender Zellen über dem Knorpelteil der Trachea gegen die relative Häufigkeit zilientragender Zellen über dem Muskelteil der Trachea in den untersuchten KO-Stämmen und in den korrespondierenden WT-Stämmen. Die Boxplots zeigen die 0, 25, 50, 75 und 100 Perzentile.

* = $p \leq 0,05$, ° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung,

4.1.3.2 Nicht-zilientragende Zellen

Die relative Häufigkeit nicht-zilientragender Zellen im cartilaginären Areal war sowohl im zervikalen als auch im thorakalen Trachealabschnitt gegenüber dem muskulären und ligamentären Areal in allen Stämmen signifikant erhöht (Tab. 11).

Keinen signifikanten Unterschied erbrachte der Vergleich nicht-zilientragender Zellen zwischen den muskulären und ligamentären Arealen der Trachea (Tab. 11).

4.1.3.3 Basalzellen

Keinen signifikanten Unterschied ergab der Vergleich der relativen Häufigkeit der Basalzellen zwischen den cartilaginären, muskulären und ligamentären Arealen in beiden Trachealabschnitten in allen untersuchten Mäusestämmen. (Tab. 11).

	Zervikaler Trachealabschnitt				Thorakaler Trachealabschnitt		
	Knorpel MW%	Muskel MW%	Band MW%		Knorpel MW%	Muskel MW%	Band MW%
	Zilientragende Zellen				Zilientragende Zellen		
M1M3WT	20 _(0,01)	32 _(0,01)	31 _(0,02)	M1M3WT	25 _(0,01)	32 _(0,01)	32 _(0,01)
M1KO	23 _(0,01)	33 _(0,02)	31 _(0,02)	M1KO	20 _(0,02)	30 _(0,02)	38 _(0,02)
M3KO	25 _(0,02)	33 _(0,02)	31 _(0,01)	M3KO	24 _(0,01)	34 _(0,03)	30 _(0,02)
M2WT	20 _(0,02)	31 _(0,02)	32 _(0,03)	M2WT	25 _(0,03)	32 _(0,01)	30 _(0,01)
M2KO	25 _(0,01)	31 _(0,01)	32 _(0,01)	M2KO	25 _(0,01)	29 _(0,01)	32 _(0,01)
	Nicht-zilientragende Zellen				Nicht-zilientragende Zellen		
M1M3WT	58 _(0,02)	47 _(0,02)	50 _(0,02)	M1M3WT	52 _(0,01)	47 _(0,02)	50 _(0,01)
M1KO	55 _(0,01)	45 _(0,01)	49 _(0,01)	M1KO	56 _(0,01)	49 _(0,02)	43 _(0,02)
M3KO	53 _(0,01)	47 _(0,02)	50 _(0,01)	M3KO	57 _(0,02)	46 _(0,03)	50 _(0,02)
M2WT	59 _(0,01)	49 _(0,01)	49 _(0,02)	M2WT	56 _(0,02)	49 _(0,01)	50 _(0,01)
M2KO	52 _(0,02)	49 _(0,01)	49 _(0,01)	M2KO	53 _(0,01)	54 _(0,01)	50 _(0,01)
	Basalzellen				Basalzellen		
M1M3WT	22 _(0,02)	21 _(0,01)	20 _(0,01)	M1M3WT	23 _(0,01)	21 _(0,01)	18 _(0,01)
M1KO	22 _(0,01)	22 _(0,01)	20 _(0,01)	M1KO	24 _(0,01)	22 _(0,01)	19 _(0,01)
M3KO	22 _(0,01)	20 _(0,01)	19 _(0,01)	M3KO	19 _(0,01)	20 _(0,01)	19 _(0,01)
M2WT	22 _(0,02)	21 _(0,01)	19 _(0,01)	M2WT	20 _(0,01)	20 _(0,01)	20 _(0,01)
M2KO	23 _(0,02)	21 _(0,02)	20 _(0,01)	M2KO	22 _(0,02)	17 _(0,02)	18 _(0,02)

Tab. 11: Tabellarische Übersicht über die relative Häufigkeit zilientragender Zellen, nicht-zilientragender Zellen und Basalzellen im Trachealepithel

Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) aus der relativen Häufigkeit von n = 5 Tieren. In Klammern ist der Standardfehler (SEM) angegeben. Gezeigt werden die relativen Häufigkeiten der Zelltypen über den cartilaginären, muskulären und ligamentären Arealen der Trachea im zervikalen und thorakalen Trachealabschnitt der verschiedenen Mäusestämme

4.1.4 Anzahl endokriner Zellen und Bürstenzellen im Trachealepithel von MR KO-Mäusen im Vergleich zum korrespondierenden WT-Stamm

Es wurde mittels immunhistochemischer Markierung die Anzahl der endokrinen Zellen und Bürstenzellen in den KO- und WT-Stämmen untersucht (Abb. 16 und Abb. 17).

4.1.4.1 Endokrine Zellen

Die relative Häufigkeit endokriner Zellen im zervikalen Trachealabschnitt war in M1KO-Tieren gegenüber der Anzahl im WT-Stamm signifikant erhöht (Tab. 13 und Abb. 19).

In M2KO- und in M3KO-Tieren konnte im zervikalen Teilabschnitt kein signifikanter Unterschied in der Anzahl endokriner Zellen ermittelt werden (Tab. 13 und Abb. 19).

Im thorakalen Trachealabschnitt zeigte der Vergleich der Anzahl endokriner Zellen zwischen den getesteten KO-Stämmen und ihrem WT-Stamm keinen signifikanten Unterschied (Tab. 13 und Abb. 19).

4.1.4.2 Bürstenzellen

Im zervikalen und thorakalen Trachealabschnitt bestand zwischen dem WT-Stamm und den getesteten KO-Stämmen kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Bürstenzellen (Tab.12 und Abb. 18).

4.1.5 Anzahl endokriner Zellen und Bürstenzellen im Trachealepithel im Vergleich zervikaler zu thorakaler Trachealabschnitt

4.1.5.1 Endokrine Zellen

Bei allen getesteten Mäusestämmen war die Anzahl endokriner Zellen im zervikalen Trachealabschnitt signifikant erhöht gegenüber der Anzahl endokriner Zellen im thorakalen Abschnitt (Tab. 13 und Abb. 19).

4.1.5.2 Bürstenzellen

Bei allen getesteten Mäusestämmen konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Bürstenzellen zwischen dem zervikalen und dem thorakalen Trachealabschnitt festgestellt werden (Tab. 12 und Abb. 18).

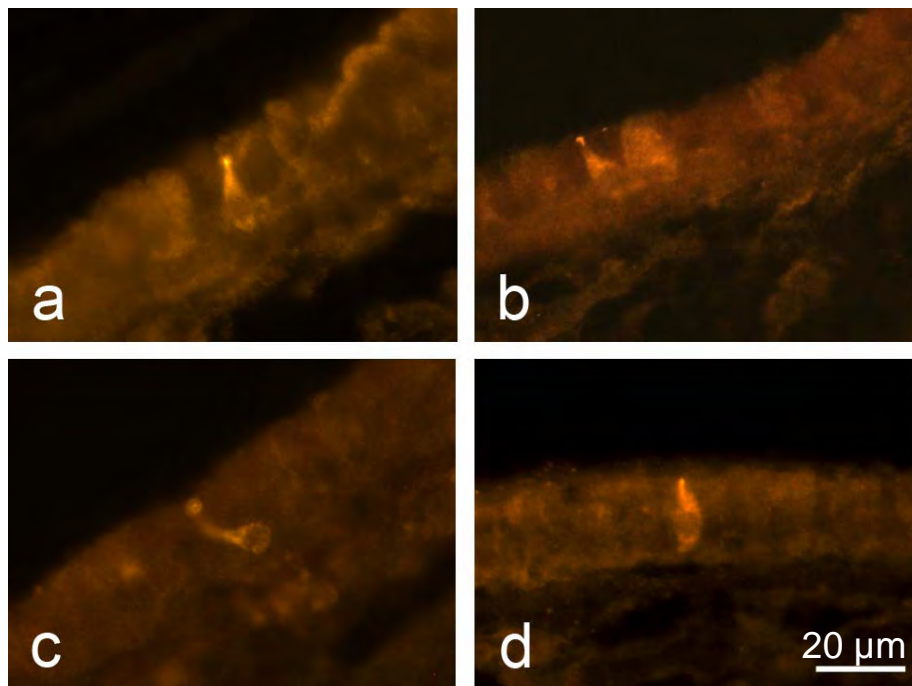


Abb. 16: Immunmarkierung der Bürstenzellen im Trachealepithel mittels eines Villin-Antikörpers

- a) Bürstenzelle in einer WT-Maus b) Bürstenzellen in einer M2KO-Maus
c) Bürstenzelle in einer M1KO-Maus d) Bürstenzelle in einer M3KO-Maus

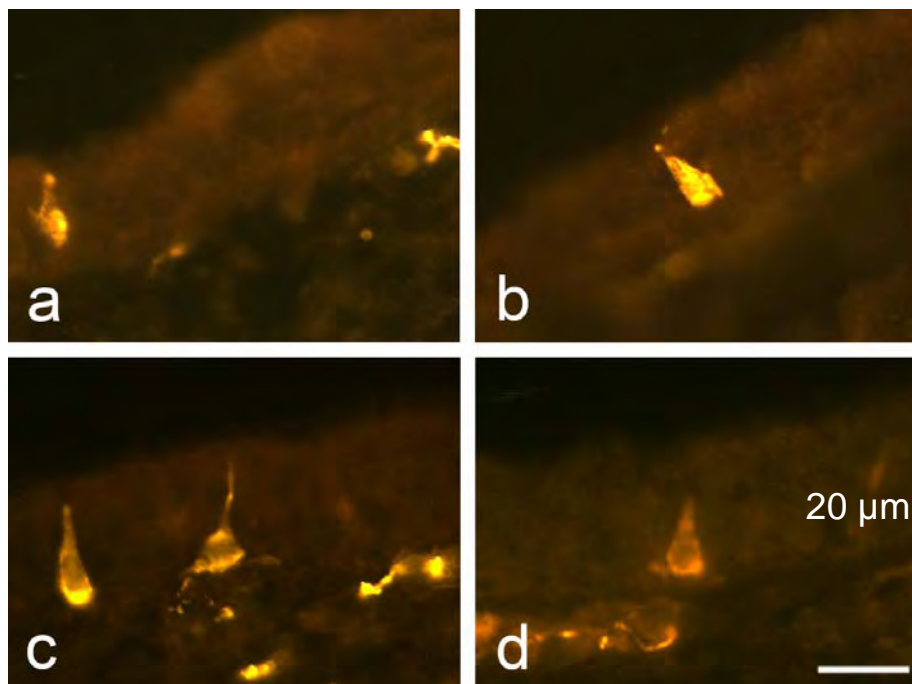


Abb. 17: Immunmarkierung der endokrinen Zellen im Trachealepithel mittels eines PGP-Antikörpers

- a) Neuroendokrine Zelle in einer WT-Maus b) Neuroendokrine Zelle in einer M2KO-Maus
c) Neuroendokrine Zellen in einer M1KO-Maus d) Neuroendokrine Zelle in einer M3KO-Maus

Villin positive Zellen zervikal							
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	MW	SEM
WT	1,77	1,18	1,90	2,86	2,07	1,96	0,27
M1KO	0,00	0,88	1,51	2,58	4,49	1,89	0,77
M2KO	0,00	4,10	1,11	1,15	2,66	1,80	0,71
M3KO	1,35	1,01	2,19	1,16	0,00	1,14	0,35
Villin positive Zellen thorakal							
WT	2,57	1,94	3,94	1,12	1,06	2,13	0,53
M1KO	0,00	1,47	2,55	0,00	0,00	0,80	0,52
M2KO	0,90	0,84	0,00	1,13	2,89	1,15	0,47
M3KO	0,89	0,00	0,00	1,19	0,00	0,42	0,26

Tab. 12: Angegeben ist die Anzahl der am zervikalen und thorakalen Trachealquerschnitt ausgezählten Villin positiven Zellen sowie deren MW und SEM aus $n = 5$ Tieren. Die Zellzahlen sind bezogen auf den Standardquerschnitt des korrespondierenden WT-Stamm C57/B6N^{ta}c. Es wurde einmal ein Standardquerschnitt für den zervikalen und einmal ein Standardquerschnitt für den thorakalen Trachealabschnitt berechnet.

(Standardquerschnitt WT-Stamm Trachea zervikal: 2734 px)

(Standardquerschnitt WT-Stamm Trachea thorakal: 2586 px)

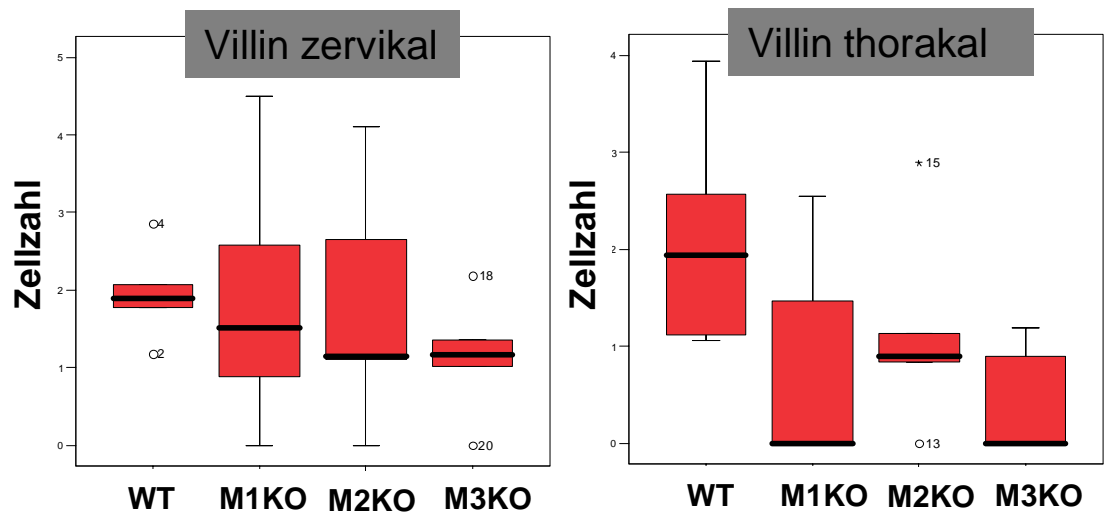


Abb. 18 Die Boxplots illustrieren die Anzahl der Villin-markierten Bürstenzellen einmal im zervikalen und einmal im thorakalen Trachealabschnitt in den untersuchten KO-Stämmen und in dem korrespondierenden WT-Stamm.

Die Boxplots zeigen die 0, 25, 50, 75 und 100 Perzentile.

° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung,

PGP 9.5 positive Zellen zervikal							
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	MW	SEM
WT	6,23	5,00	5,13	8,92	4,14	5,88	0,83
M1KO	9,19	14,38	22,28	18,22	10,36	14,89	2,44
M2KO	5,19	7,77	2,85	7,87	8,54	6,44	1,07
M3KO	8,82	6,15	17,09	13,66	10,23	11,19	1,91
PGP 9.5 positive Zellen thorakal							
WT	4,33	3,74	3,64	5,42	3,18	4,06	0,39
M1KO	1,15	5,98	3,65	3,82	3,80	3,68	0,77
M2KO	3,17	2,17	1,68	3,19	6,74	3,39	0,89
M3KO	3,21	7,57	2,69	7,56	3,71	4,95	1,08

Tab. 13: Angegeben ist die Anzahl der am zervikalen und thorakalen Trachealquerschnitt ausgezählten PGP positiven Zellen sowie deren MW und SEM aus $n = 5$ Tieren. Die Zellzahlen sind bezogen auf den Standardquerschnitt des korrespondierenden WT-Stamm C57/B6Ntac. Es wurde einmal ein Standardquerschnitt für den zervikalen und einmal ein Standardquerschnitt für den thorakalen Trachealabschnitt berechnet.

(Standardquerschnitt WT-Stamm Trachea zervikal: 2734 px)

(Standardquerschnitt WT-Stamm Trachea thorakal: 2586 px)

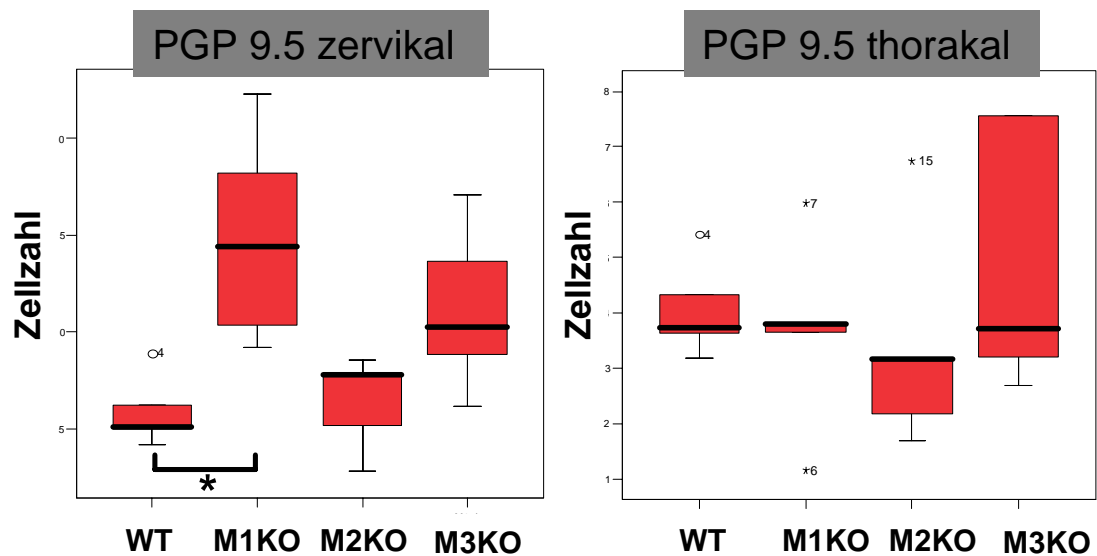


Abb. 19 Die Boxplots illustrieren die Anzahl der PGP-markierten endokrinen Zellen einmal im zervikalen und einmal im thorakalen Trachealabschnitt in den untersuchten KO-Stämmen und in dem korrespondierenden WT-Stamm.

Die Boxplots zeigen die 0, 25, 50, 75 und 100 Perzentile.

* = $p \leq 0,05$, ° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung,

4.1.6 Ultrastruktur des Trachealepithels bei MR KO-Mäusen im Vergleich zu ihrem korrespondierenden WT-Stamm

4.1.6.1 Vorkommen der unterschiedlichen Zelltypen

Bei allen untersuchten Mäusestämmen konnten zilientragende Zellen und bei den nicht-zilientragenden Zellen Basalzellen, sekretorische Zellen, endokrine Zellen und Bürstenzellen gefunden werden. Es wurde keine Becherzelle gefunden.

4.1.6.2 Zilientragende Zellen

Die zilientragende Zelle reichte bei allen untersuchten Mäusestämmen von der Basalmembran bis zum Lumen der Trachea. Mit ihrem basalen Ende saß sie breit der Basalmembran auf. Ihr Zytoplasma erschien überwiegend weniger elektronendicht als bei den nicht-zilientragenden Zellen. In allen Stämmen war sie vielgestaltig in ihrer Form, von säulenartig bis prismatisch. An ihrer luminalen Oberfläche trug sie Zilien und in größerer oder kleinerer Anzahl vorkommende Mikrovilli. Dies konnte bei allen Mäusestämmen beobachtet werden. Auch die Untersuchung der Zellorganellen zeigte bei den verwendeten Mäusestämmen keine Unterschiede. In allen Stämmen befand sich der Kern im unteren Drittel der Zelle, meist mit einer irregulären Form. Die großen Mitochondrien waren über die ganze Zelle verteilt, schwerpunktmäßig waren sie im oberen Drittel der Zelle zu finden. Dort befand sich auch der Golgi-Apparat. Ribosomen kamen teils frei, teils in Gruppen vor. Das glatte und das raue ER waren über die gesamte Zelle verstreut. In einigen Zellen war es in großer Menge vorhanden, in anderen Zellen nur geringer ausgeprägt. Zusammenfassend zeigten die untersuchten ultrastrukturellen Merkmale in diesem Zelltyp keinen Unterschied bei den getesteten MR KO-Tieren im Vergleich zu ihrem korrespondierenden WT-Stamm (Abb. 20).

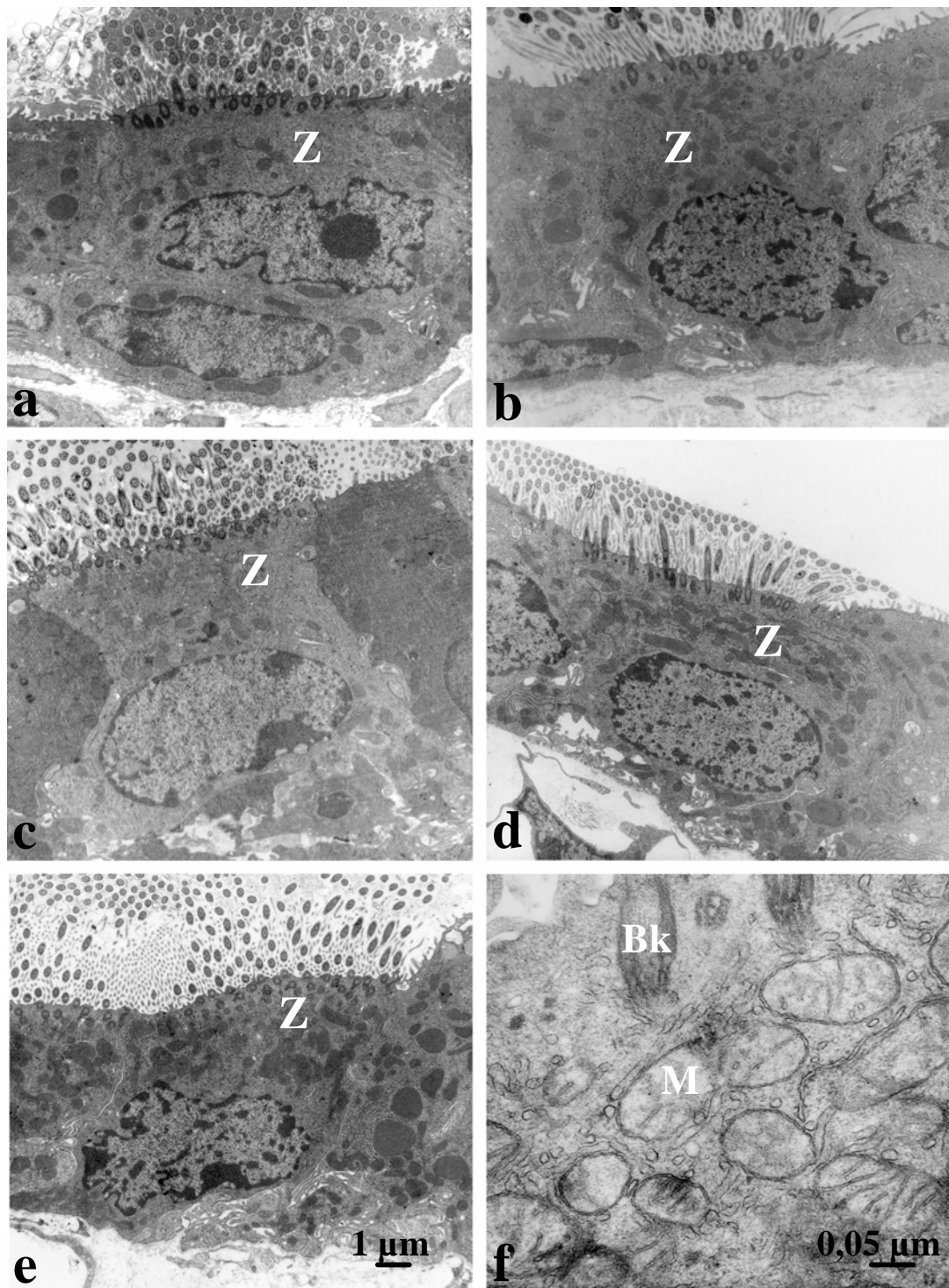


Abb. 20: Ultrastruktur zilientragender Zellen plus Detailausschnitt

Z = zilientragende Zelle, Bk = Anschnitt Basalkörper, M = Mitochondrium

a) zilientragende Zelle in einer M1M3WT-Maus

b) zilientragende Zelle in einer M2WT-Maus

c) zilientragende Zelle in einer M1KO-Maus

d) zilientragende Zelle in einer M2KO-Maus

e) zilientragende Zelle in einer M3KO-Maus

f) Detailausschnitt Zytoplasma einer zilientragenden Zelle

4.1.6.3 Sekretorische Zellen

Dieser zahlreich vorkommende Zelltyp reichte bei allen Tieren von der Basalmembran bis zum Lumen. Teilweise wölbte sich der apikale Teil der Zelle weit in das Lumen hinein. Der meist ovale Kern befand sich in der Mitte der Zelle. Das Zytoplasma war meist sehr elektronendicht. In diesem Zelltyp befand sich bei allen Stämmen eine große Menge an Zellorganellen, wie z. B. ausgedehnte Felder von rauem und glattem ER. In der Zellapex konnten bei allen Stämmen vergleichbare sekretorische Vesikel gefunden werden. In jedem Stamm konnte von Zelle zu Zelle eine variierende Anzahl und Größe dieser Vesikel gefunden werden. Zusammenfassend zeigte sich kein ultrastruktureller Unterschied in diesem Zelltyp zwischen den MR KO-Mäusen und ihrem korrespondierenden WT-Stamm (Abb. 21).

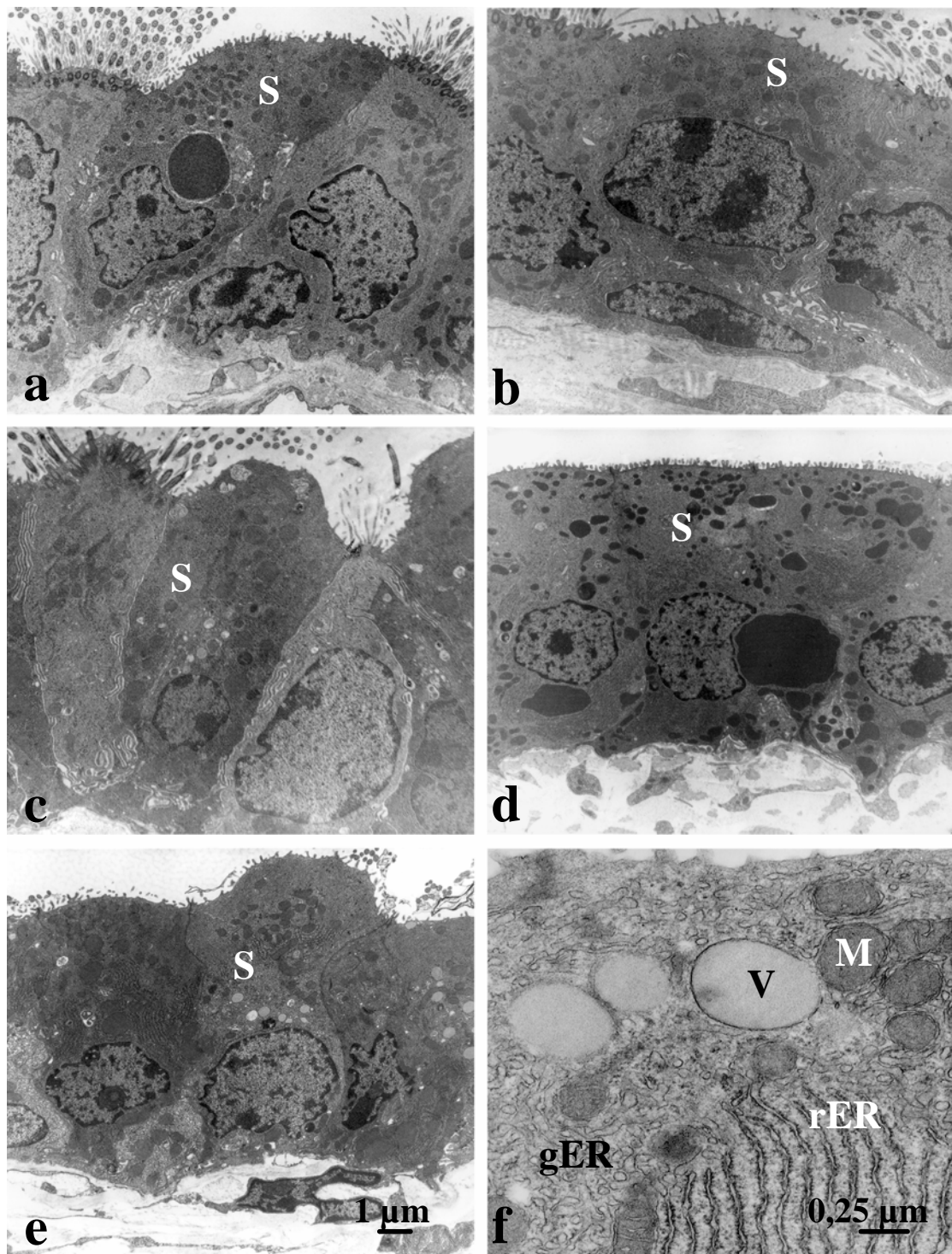


Abb. 21: Ultrastruktur sekretorischer Zellen plus Detailausschnitt

S = sekretorische Zelle, M = Mitochondrium, rER = raues Endoplasmatisches Retikulum

gER = glattes Endoplasmatisches Retikulum, V = sekretorische Vesikel

a) sekretorische Zelle in einer M1M3WT-Maus

b) sekretorische Zelle in einer M2WT-Maus

c) sekretorische Zelle in einer M1KO-Maus

d) sekretorische Zelle in einer M2KO-Maus

e) sekretorische Zelle in einer M3KO-Maus

f) Detailausschnitt Zytoplasma einer sekretorischen Zelle

4.1.6.4 Endokrine Zellen

Die endokrine Zelle hatte bei allen untersuchten Mäusestämmen breiten Kontakt zur Basalmembran und reichte bis zum Lumen der Trachea. Ihre Form war vielgestaltig und an ihrer Oberfläche trug sie keine Zilien, sondern nur eine variierende Anzahl von Mikrovilli. Bei diesem Zelltyp befand sich der Kern im basalen Teil der Zelle. Ihr Zytoplasma war meist sehr wenig elektronendicht. Die untersuchten Zellen aller Stämme enthielten zahlreiche Mitochondrien und das ER konnte in der ganzen Zelle gefunden werden. In diesem Zelltyp konnten bei allen Mäusen kugelförmige Granula im basalen Teil der Zelle beobachtet werden. Diese Granula waren unterschiedlich groß (ca. 100-300 μm) und ihr Inhalt unterschiedlich elektronendicht. Alle Granula waren von einer Membran begrenzt, oft war der Inhalt von dieser Membran durch eine hellere Zone (Halo) abgegrenzt. Zusammenfassend konnte kein morphologischer Unterschied in diesem Zelltyp beim Vergleich der MR KO-Mäuse zu ihrem WT-Stamm festgestellt werden (Abb. 22).

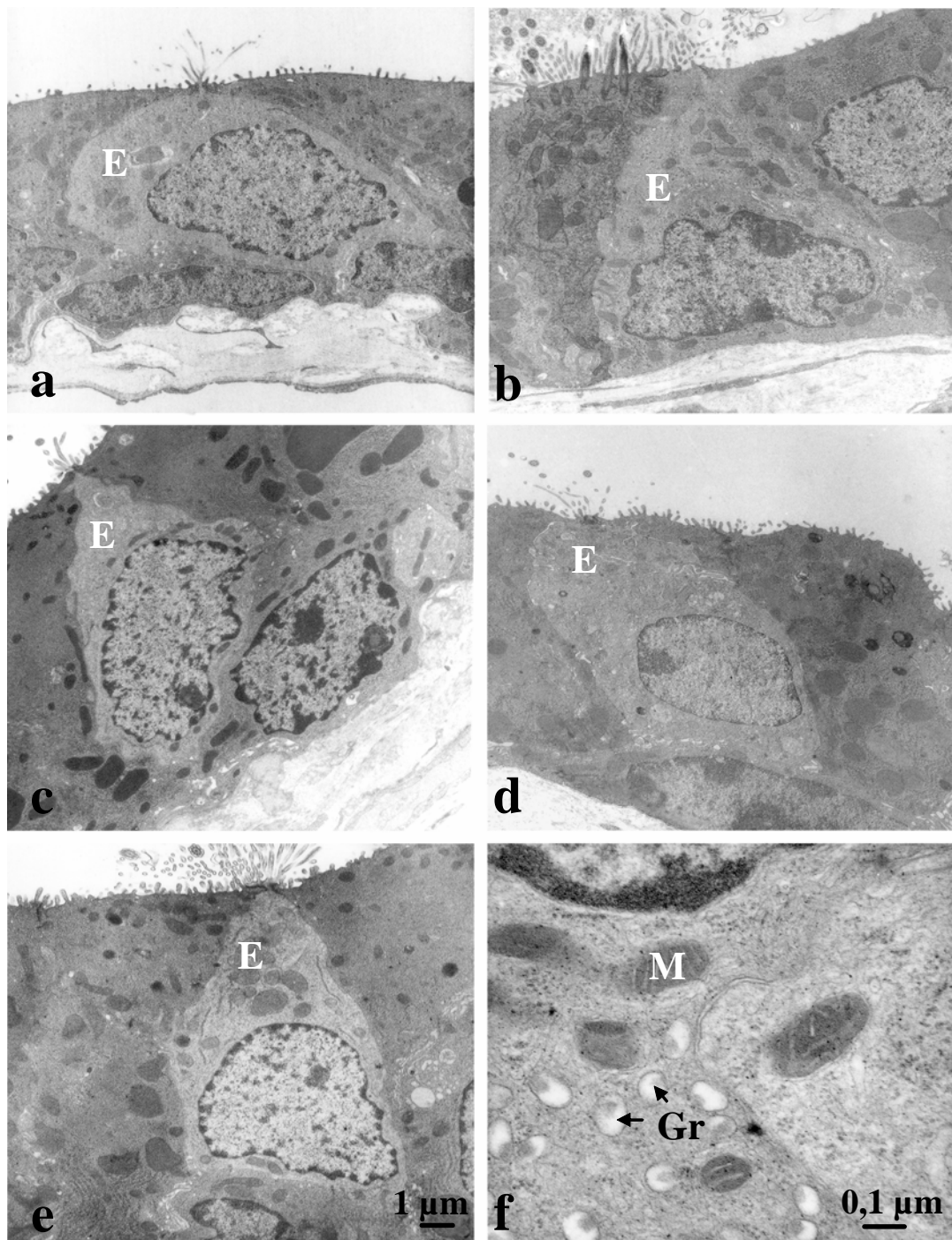


Abb. 22: Ultrastruktur endokriner Zellen plus Detailausschnitt

E = endokrine Zelle, Gr = Granula, M = Mitochondrium

a) endokrine Zelle in einer M1M3WT-Maus

b) endokrine Zelle in einer M2WT-Maus

c) endokrine Zelle in einer M1KO-Maus

d) endokrine Zelle in einer M2KO-Maus

e) endokrine Zelle in einer M3KO-Maus

f) Detailausschnitt Zytoplasma und Zellkern einer endokrinen Zelle

4.1.6.5 Bürstenzellen

Bei allen Tieren reichte die Bürstenzelle von der Basalmembran bis zum Lumen und trug an ihrer luminalen Oberfläche ihr zelltypisch dicht gepacktes Bündel von Mikrovilli. Die Mikrovilli enthielten Filamente, die bis in das Zytoplasma der Zelle vorreichten. Bei allen Tieren fanden sich im Zytoplasma Bündel von Fibrillen und Ansammlungen von membranumgebenen Vesikeln, schwerpunktmäßig im oberen Drittel der Zelle. Alle untersuchten Zellen enthielten große Felder von rauem ER, große Mitochondrien und ausgedehnte Golgi-Apparat Areale. Zusammenfassend zeigte sich kein ultrastruktureller Unterschied in dieser Zelle zwischen den getesteten MR KO-Stämmen und dem WT-Stamm (Abb. 23).

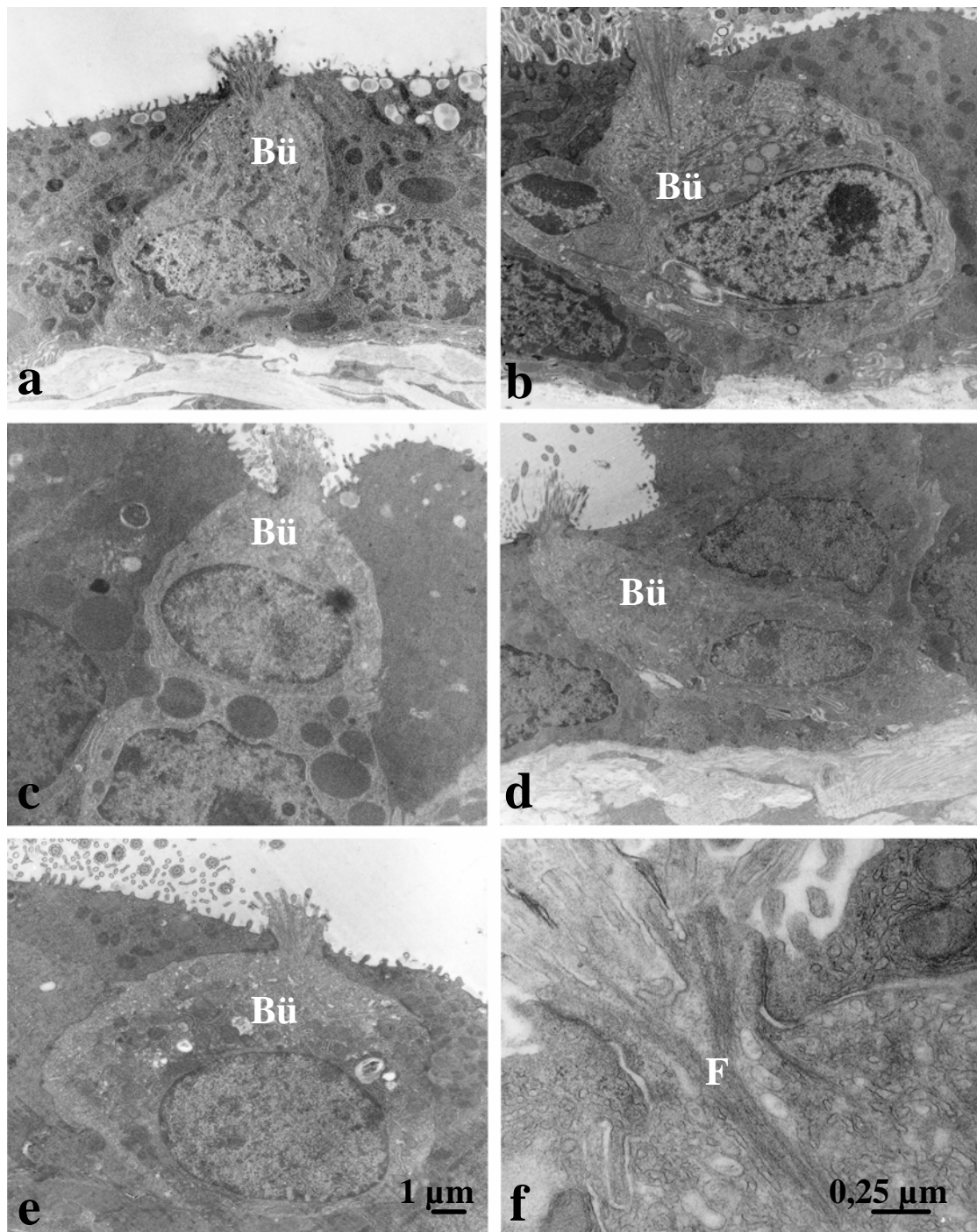


Abb. 23: Ultrastruktur der Bürstenzelle plus Detailausschnitt

B = Bürstenzelle, F = Filamente

- a) Bürstenzelle in einer M1M3WT-Maus
- b) Bürstenzelle in einer M2WT-Maus
- c) Bürstenzelle in einer M1KO-Maus
- d) Bürstenzelle in einer M2KO-Maus
- e) Bürstenzelle in einer M3KO-Maus
- f) Detailausschnitt apikaler Teil einer Bürstenzelle

4.1.6.6 Basalzellen

Die Basalzelle hatte bei allen Mäusestämmen breiten Kontakt zur Basalmembran und reichte nicht bis zum Lumen der Trachea. Sie war vielgestaltig, meist von länglicher Form. Ein großes Kern/Zytoplasmaverhältnis war bei allen Stämmen vorhanden. Das Zytoplasma dieser Zelle enthielt bei allen Tieren in mehr oder weniger großer Anzahl vorkommende Mitochondrien, Ribosomen und Bündel von Intermediärfilamenten. Zusammenfassend konnte kein morphologischer Unterschied in dieser Zelle bei den MR KO-Mäusen im Vergleich zu deren korrespondierendem WT-Stamm festgestellt werden (Abb. 24).

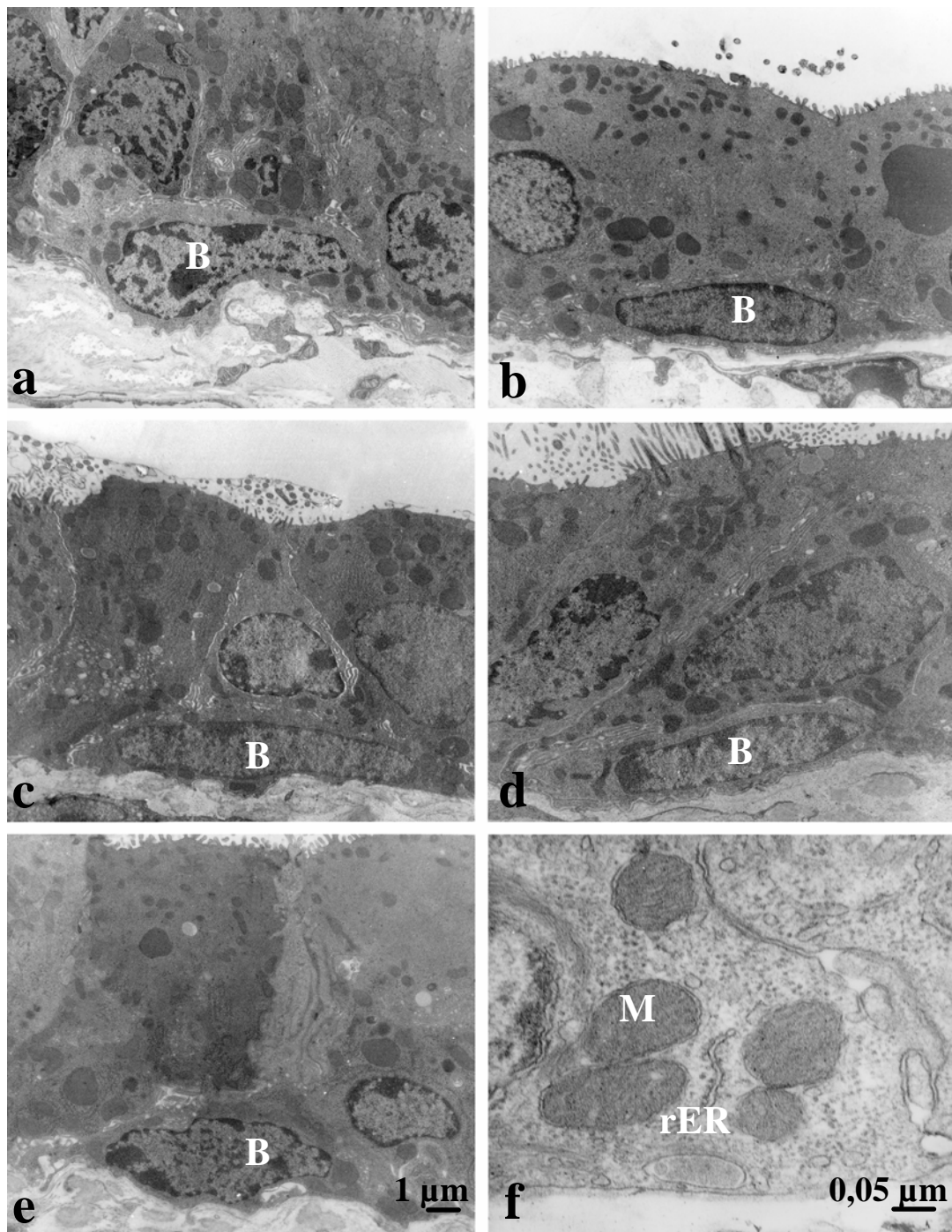


Abb. 24: Ultrastruktur der Basalzellen plus Detailausschnitt

B = Basalzelle, M = Mitochondrium, rER = raues Endoplasmatisches Retikulum

a) Basalzelle in einer M1M3WT-Maus

b) Basalzelle in einer M2WT-Maus

c) Basalzelle in einer M1KO-Maus

d) Basalzelle in einer M2KO-Maus

e) Basalzelle in einer M3KO-Maus

f) Detailausschnitt Zytoplasma einer Basalzelle

4.1.6.7 Ausbildung der Zell-Zellkontakte

4.1.6.7.1 Zell-Zellkontakte zwischen zwei ziliotragenden Zellen

Der Zell-Zellkontakt zwischen zwei ziliotragenden Zellen bestand bei den KO-Tieren und ihrem korrespondierenden WT-Stamm aus den drei Komponenten des Zell-Zell-Verbindungskomplexes. Der Verbindungskomplex bestand aus der apikalen Zonula occludens, der mittleren Zonula adhaerens und der weiter basal folgenden Macula adhaerens. Die folgenden Befunde der untersuchten Ultrastruktur dieser Komplexe galten für die untersuchten KO-Stämme und ihren korrespondierenden WT-Stamm. Es konnte keine Abweichung in der Ultrastruktur gefunden werden (Abb. 25).

Zonula occludens

Die Zonula occludens befand sich nahe der Zellspitzen der benachbarten Zellen und erschien elektronendichter als ihre Umgebung. Der Interzellularspalt war kaum sichtbar und in der Zonula occludens konnten punktförmige Verbindungen zwischen den beiden Zellen durch dortige Verschmelzung der Plasmamembran beobachtet werden. Bei allen Tieren konnten diese Verschlusspunkte festgestellt werden. Teilweise waren mehrere hintereinander aufgereihte Verschlusspunkte zu erkennen.

Zonula adhaerens

In basaler Richtung folgte der Zonula occludens die Zonula adhaerens. Bei allen Tieren zeigte dieser breite Kontaktgürtel keine morphologischen Auffälligkeiten. Die Zonula adhaerens erschien elektronendichter als ihre Umgebung und der Interzellularspalt war an dieser Stelle sehr eng.

Macula adhaerens

Der dritte Teil des Zell-Zell-Verbindungskomplexes bildete die Verbindung durch die Macula adhaerens oder die Desmosomen. Wiederum konnte kein Unterschied in der Ultrastruktur zwischen den MR KO-Mäusen und ihrem korrespondierenden WT-Stamm beobachtet werden. Bei allen Tieren erschien die Macula adhaerens

als elektronendichter, dadurch sehr dunkel wirkender Plaque auf beiden Seiten der benachbarten Zellen.

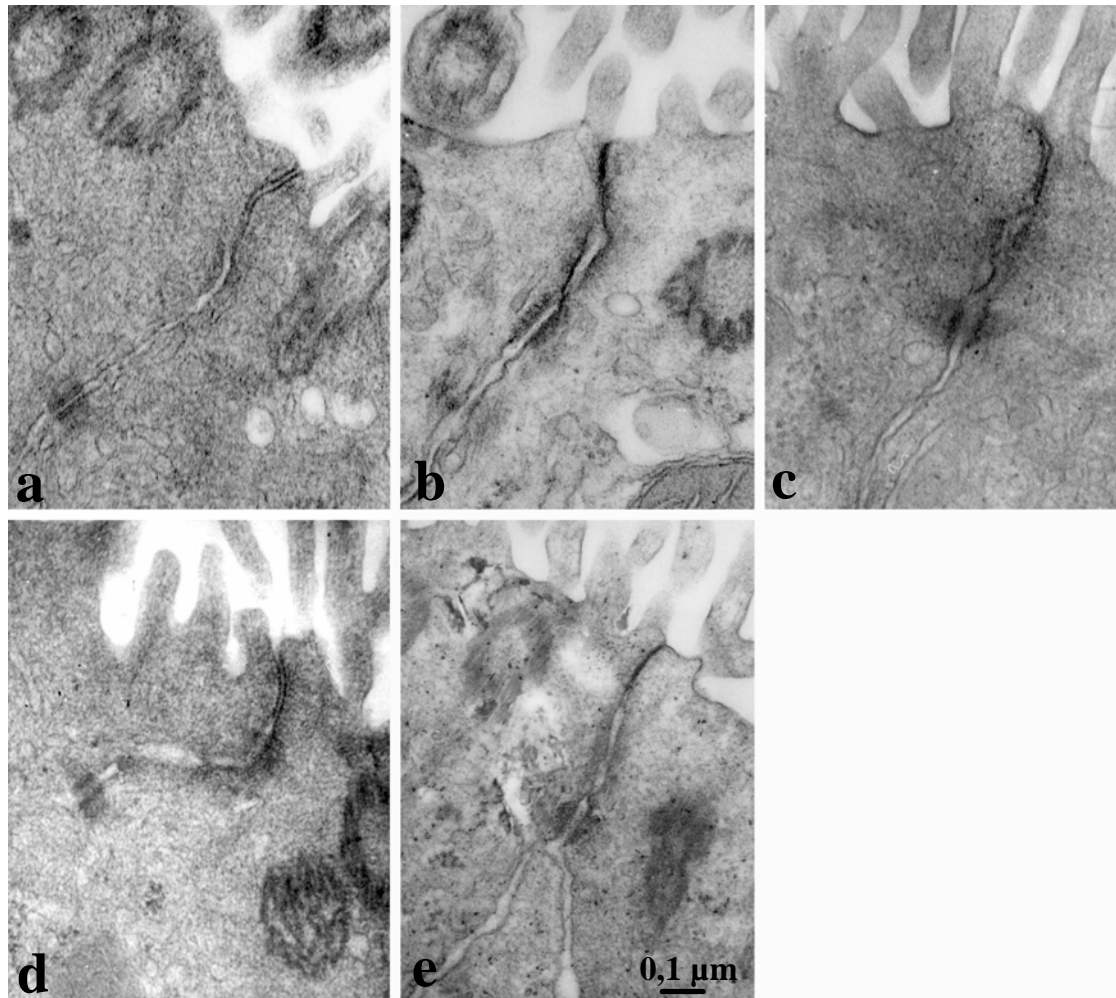


Abb. 25: Ultrastruktur der Zell-Zellkontakte zwischen zilientragenden Zellen

- a) Zell-Zellkontakt in einer M1M3WT-Maus
- b) Zell-Zellkontakt in einer M1KO-Maus
- c) Zell-Zellkontakt in einer M3KO-Maus
- d) Zell-Zellkontakt in einer M2WT-Maus
- e) Zell-Zellkontakt in einer M2KO-Maus

4.1.6.7.2 Zell-Zellkontakte zwischen nicht-zilientragenden Zellen

Die Untersuchung der Ultrastruktur der Zell-Zellkontakte zwischen zwei nicht-zilientragenden (sekretorischen) Zellen erbrachte die gleichen Ergebnisse wie die Untersuchung der Ultrastruktur zwischen zwei zilientragenden Zellen (Abb. 26).

Auch hier konnte kein morphologischer Unterschied zwischen den KO-Tieren und ihren korrespondierenden WT-Tieren festgestellt werden (siehe Kapitel 4.1.6.7.1: „Zell-Zellkontakte zwischen zwei zilientragenden Zellen“).

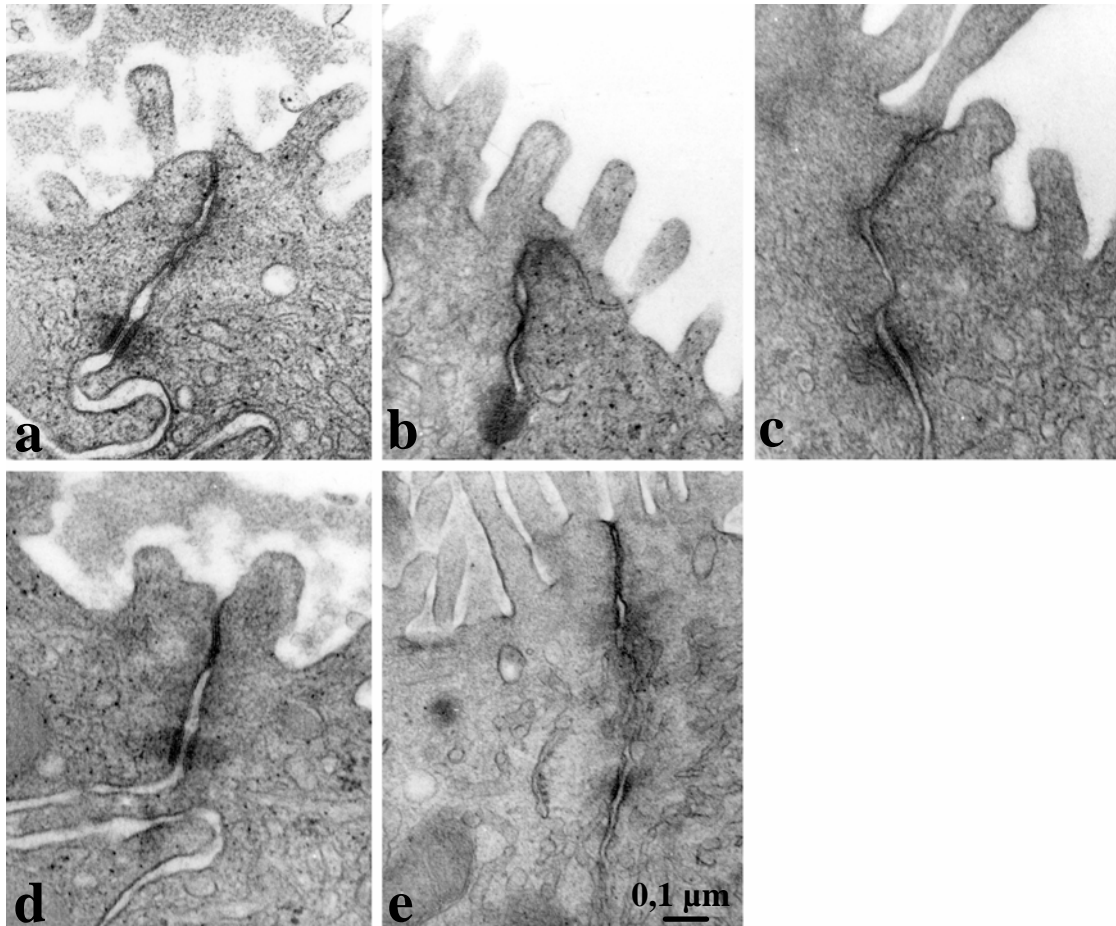


Abb. 26: Ultrastruktur der Zell-Zellkontakte zwischen zwei sekretorischen Zellen

- a) Zell-Zellkontakt in einer M1M3WT-Maus
- b) Zell-Zellkontakt in einer M1KO-Maus
- c) Zell-Zellkontakt in einer M3KO-Maus
- d) Zell-Zellkontakt in einer M2WT-Maus
- e) Zell-Zellkontakt in einer M2KO-Maus

4.1.6.7.3 Zell-Zellkontakte zwischen einer zilientragenden und einer nicht-zilientragenden Zelle

Die Untersuchung der Ultrastruktur der Zell-Zellkontakte zwischen einer zilientragenden und einer nicht-zilientragenden Zelle erbrachte die gleichen Ergebnisse wie die Untersuchung der Ultrastruktur zwischen zwei zilientragenden

Zellen (Abb. 27). Auch hier konnte kein morphologischer Unterschied zwischen den MR KO-Tieren und ihren korrespondierenden WT-Tieren festgestellt werden (siehe Kapitel 4.1.6.7.1: „Zell-Zellkontakte zwischen zilientragenden Zellen“).

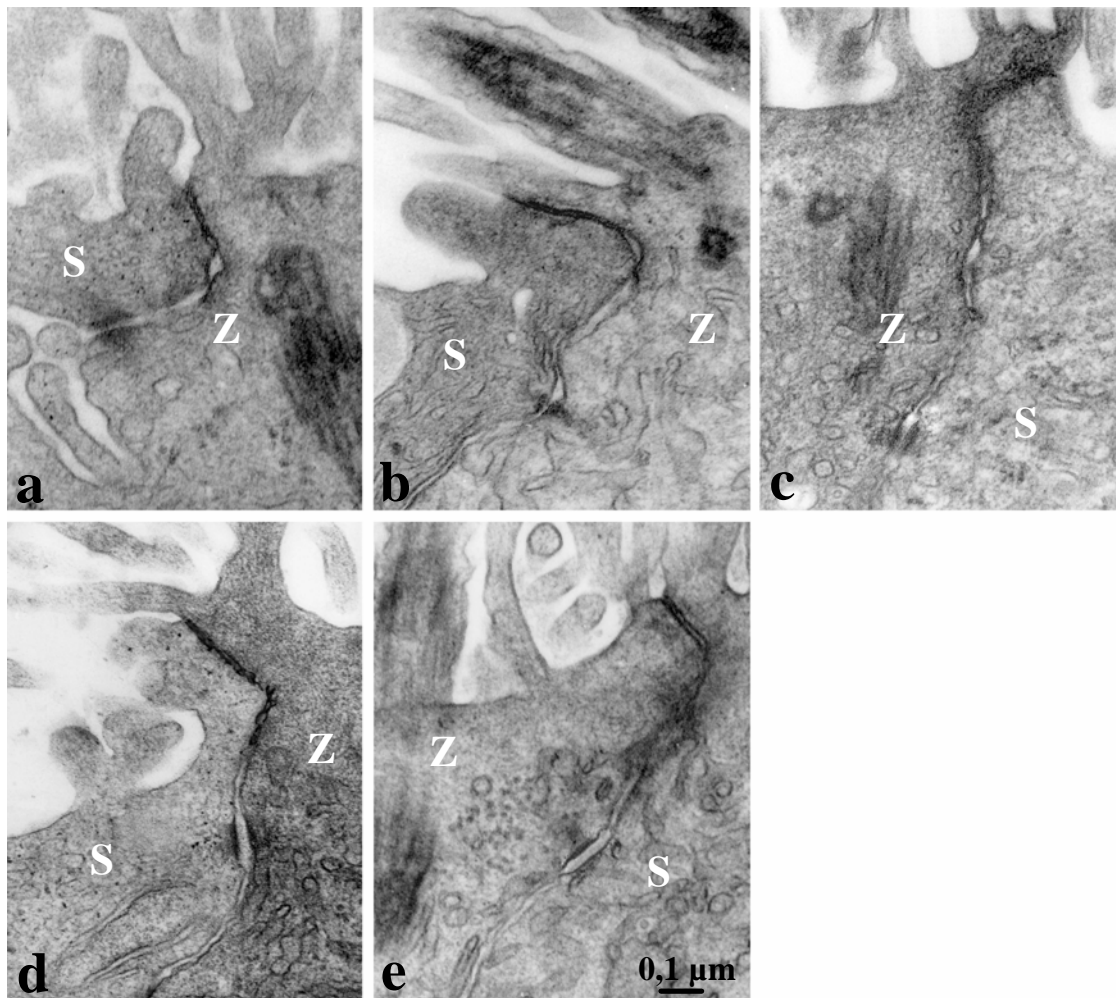


Abb. 27: Ultrastruktur der Zell-Zellkontakte zwischen einer zilientragenden und einer sekretorischen Zelle

Z = zilientragende Zelle, S = sekretorische Zelle

- a) Zell-Zellkontakt in einer M1M3WT-Maus
- b) Zell-Zellkontakt in einer M1KO-Maus
- c) Zell-Zellkontakt in einer M3KO-Maus
- d) Zell-Zellkontakt in einer M2WT-Maus
- e) Zell-Zellkontakt in einer M2KO-Maus

4.1.6.8 Zilienmorphologie

4.1.6.8.1 Zilienquerschnitt und Zilienlängsschnitt

Bei allen getesteten MR KO-Stämmen und ihren korrespondierenden WT-Stämmen ergaben sich die nachfolgenden ultrastrukturellen Befunde des Zilienquerschnittes. Es waren neun Mikrotubulusdoubletten ringförmig und ein Mikrotubulusdoublett im Zentrum angeordnet. Der Ring aus Mikrotubulusdoubletten war von einer Membran umschlossen. Alle Mikrotubulusdoubletten bestanden aus einem A- und einem B-Tubulus. Vom jedem äußeren A-Tubulus gingen Verbindungen zum zentralen Mikrotubulusdoublett aus. Auch die Verbindung der neun Mikrotubulusdoubletten durch die Dyneinärmchen konnte bei allen Mäusen beobachtet werden. Zusammenfassend erbrachte der Vergleich der Morphologie des Kinozilienquerschnittes keinen Unterschied zwischen den WT-Mäusen und den untersuchten MR KO-Stämmen (Abb. 28).

Die Zilienlängsschnitte zeigten ebenfalls keine morphologischen Unterschiede zwischen den KO-Stämmen und deren korrespondierenden WT-Stämmen. Der Zilienschaft beinhaltete bei allen Tieren longitudinal angeordnete Mikrotubuli, welche insgesamt von einer Membran umgeben waren. Bei allen Stämmen konnte in einigen Anschnitten auf der Oberfläche der Zilienspitze krallenartige Fortsätze dokumentiert werden. Die Verankerung im Zytoplasma der Zelle erfolgte über die Basalkörper. In einigen Anschnitten war der seitlich herausragende basale Fuß der Zilien zu sehen. Bei dem Basalkörper und dem seitlichen Fuß konnten keine ultrastrukturellen Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen gefunden werden (Abb. 28).

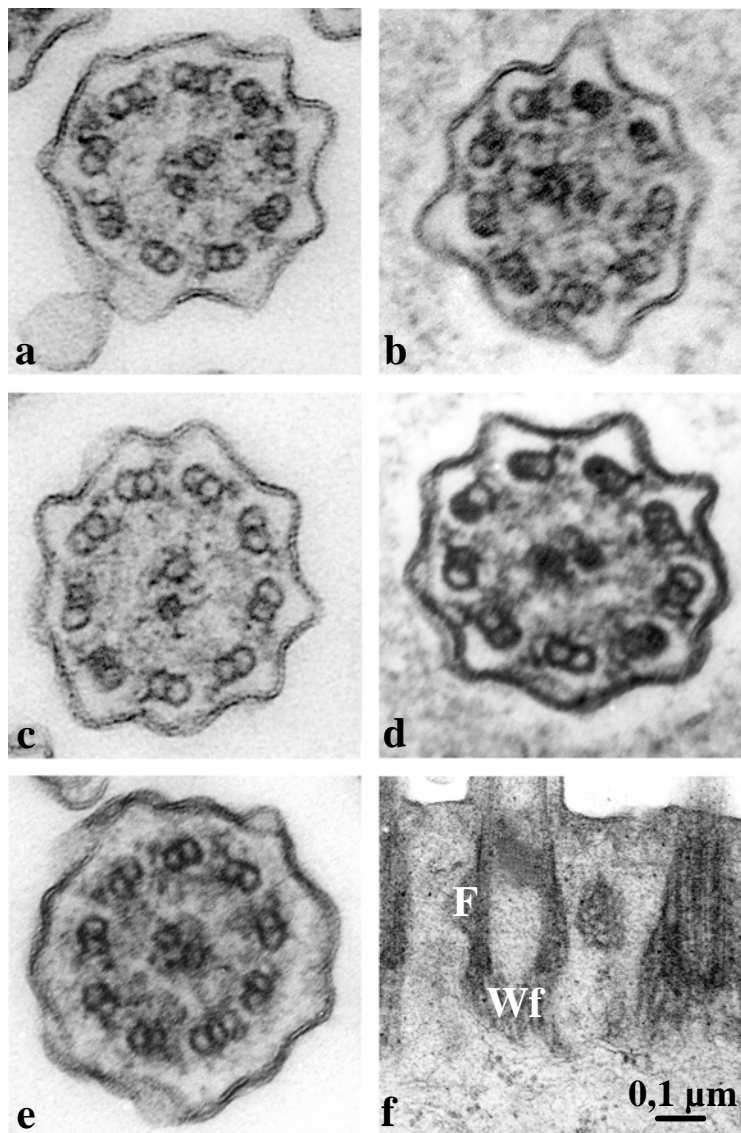


Abb. 28: Ultrastruktur des Zilienquerschnittes und Detailausschnitt eines Zilienlängsschnittes

F = seitlicher Fuß, Wf = Wurzelfasern

- a) Zilienquerschnitt in einer M1M3WT-Maus
- b) Zilienquerschnitt in einer M2WT-Maus
- c) Zilienquerschnitt in einer M1KO-Maus
- d) Zilienquerschnitt in einer M2KO-Maus
- e) Zilienquerschnitt in einer M3KO-Maus
- f) Detailausschnitt eines Zilienlängsschnittes

4.1.6.9 Zusammenfassung der elektronenmikroskopischen Befunde

Es konnte kein morphologischer Unterschied hinsichtlich der zellulären Ultrastruktur, der Zilienmorphologie und der Ausbildung der Zell-Zellkontakte zwischen den MR KO-Tieren und ihrem korrespondierenden WT-Stamm festgestellt werden.

4.2 Funktionelle Befunde

4.2.1 Messungen der Partikeltransportgeschwindigkeit

4.2.1.1 Etablierung des Messsystems

4.2.1.1.1 Mäuse aus konventioneller Haltung

Zur Etablierung des Messsystems wurden 4 Mäuse aus konventioneller Haltung eingesetzt und die Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) über einen Zeitraum von einer Stunde gemessen. Der Einsatz von weiteren Versuchstieren aus konventioneller Haltung konnte aufgrund einer sehr breiten Streuung der PTG, bis hin zum völligen Stillstand des Partikeltransportes bei zwei Versuchstieren, nicht beibehalten werden. Für die weiteren Messungen wurden Tiere aus spezifiziert pathogen-freier Haltung (SPF-Haltung) eingesetzt.

4.2.1.1.2 PTG nach Zugabe von ATP

Die exogene Zugabe von ATP in einer Konzentration von 100 μM nach 15 min Messdauer steigerte die Geschwindigkeit der transportierten Partikel innerhalb einer min um im Mittel 77% (Abb. 29). Bei Partikeln mit definierter Wegstrecke konnte in dieser Zeit eine Steigerung der Geschwindigkeit um im Mittel 47% gemessen werden. Nach weiteren zwei min konnte erneut eine Steigerung der PTG um im Mittel 21% bzw. 23% zur vorherigen Geschwindigkeitsmessung auf den Maximalwert von 89 $\mu\text{m/s}$ bzw. 95 $\mu\text{m/s}$ gesteigert werden (Abb. 29). Danach zeigte sich ein Abfall der PTG, die sich anschließend für die restliche Versuchsdauer auf einem Plateau hielt. Der Einsatz von ATP zeigte somit die Möglichkeit, mit diesem Messsystem auch eine pharmakologisch induzierte, schnell einsetzende Änderung der Partikeltransportgeschwindigkeit erfassen zu können (Abb. 29).

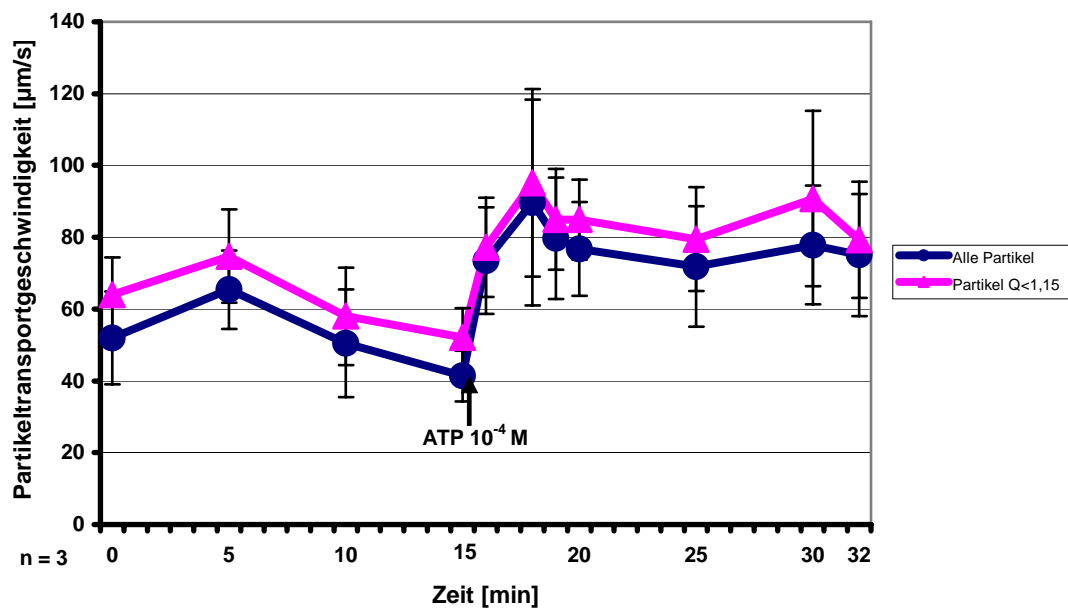


Abb. 29: PTG nach ATP-Zugabe

Dargestellt sind die MW der Geschwindigkeitsmessungen nach Zugabe von ATP mit dazugehörigem SEM. Die Kurve mit Kreissymbolen zeigt die Werte aller gemessenen Partikel. Die Kurve mit dreieckigen Symbolen zeigt nur Werte solcher Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen einem Start- und Endpunkt der Messungen nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht ($Q < 1,15$).

4.2.1.1.3 Versuchsdauer und Versuchseinteilung

Um einen Überblick über die zeitliche Dauer der Experimente und den geeigneten Zeitpunkt für eine Substanzzugabe zu erhalten, wurde in der Trachea ohne weitere exogene Beeinflussung die Geschwindigkeit der transportierten Partikel über einen Zeitraum von einer Stunde gemessen (Abb. 30). Die Diagrammkurven der wie oben unterschiedlich ausgewerteten Transportgeschwindigkeiten verliefen nahezu parallel, wobei der Mittelwert der Geschwindigkeit der Partikel mit vordefinierter Wegstrecke immer etwas höher war, als der Mittelwert aller transportierten Partikel. Während der ersten zehn min Messdauer zeigten alle transportierten Partikel eine Abnahme ihrer Transportgeschwindigkeit im Mittel

um 42% (32% bei vordefinierter Wegstrecke). Die nächsten zehn min hielt sich die Transportgeschwindigkeit auf einem Plateau, um danach erneut im Mittel um 47% (bzw. 36%) abzufallen. Die restlichen Messungen zeigten wieder eine Stabilisierung der Geschwindigkeit. Nach einer Messdauer von 60 min erfolgte eine exogene Zugabe von ATP in einer Konzentration von 100 μM (10^{-4} M). ATP als bekannter Stimulus der Zilienschlagfrequenz und somit der PTG diene als MR-unabhängiger Stimulus und in diesem Fall zur Überprüfung der Vitalität der Trachea. Mit einer Steigerung der PTG aller Partikel zum nächsten Messpunkt um das fünffache des Ausgangswertes (um das 3,5fache des Ausgangswertes bei vordefinierter Wegstrecke) konnte die Vitalität der Trachea nach einer Versuchsdauer von 60 min eindeutig nachgewiesen werden.

Zu jedem Messpunkt waren genügend Partikel für eine Auswertung vorhanden. Die Anzahl der gemessenen Partikel belief sich pro Messpunkt und Tier auf 50 bis 300 Partikel. Dabei war eine Tendenz zu erkennen, dass mit abnehmender Geschwindigkeit der Partikel auch die Anzahl der Partikel in der Auswertung abnahm. Liegen gebliebene Partikel wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Anhand oben genannter Ergebnisse orientierte sich der Ablauf der folgenden Versuche. Start der Messung erfolgte 30 Min nach Tod des Tieres mit anschließender 15-minütiger Äquilibrationszeit der Trachea an das System. Die erste Substanzzugabe bei allen Versuchen begann im ersten Geschwindigkeitsplateau 15 min nach Messbeginn. Die Versuchsdauer blieb im Rahmen der gemessenen Stunde und endete mit einer MR-unabhängigen Stimulation der Zellen durch ATP-Zugabe.

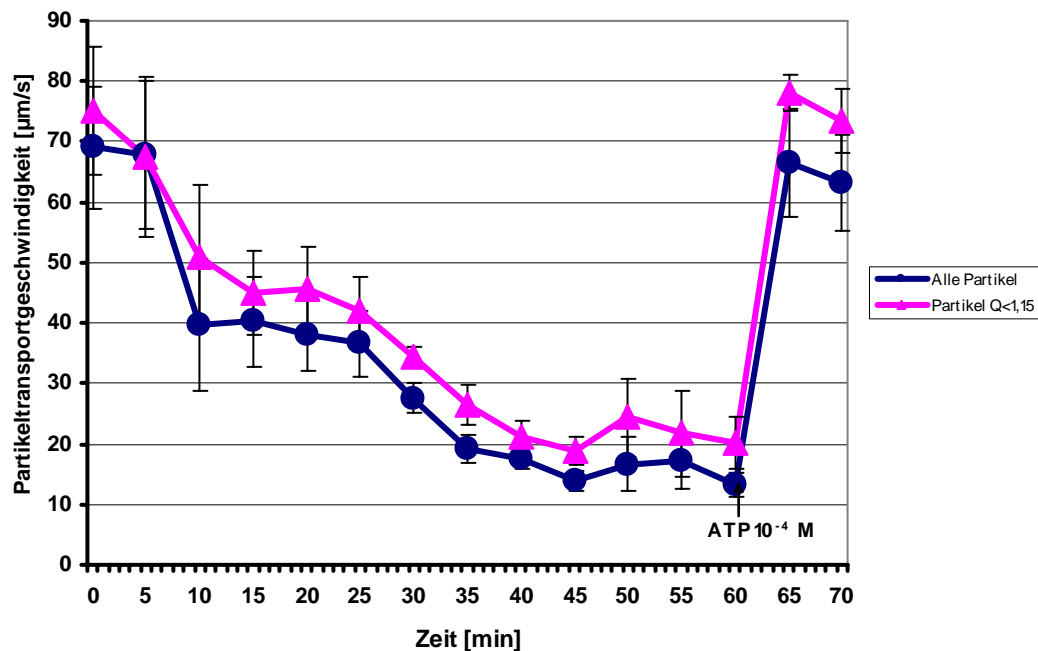


Abb. 30: PTG nach einer Versuchsdauer von 1 h, n = 3 Tiere

Dargestellt sind die MW der Geschwindigkeitsmessungen mit dazugehörigem Standardfehler (SEM). Die Kurve mit Kreissymbolen zeigt die Werte aller transportierten Partikel. Die Kurve mit dreieckigen Symbolen zeigt nur solche Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen einem Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht ($Q < 1,15$). Die Zugabe von ATP nach 60 min Versuchsdauer diente zur Überprüfung der Vitalität der Trachea 1,5 h nach Tod des Tieres.

4.2.1.1.4 Ermittlung einer adäquaten Muskarinkonzentration zur effektiven Steigerung der PTG

Zunächst wurde Muskarin in einer Konzentration von 10^{-6} M nach einer Messdauer von 15 min zugegeben (Abb. 31). Die PTG wurde während der nächsten 15 min in regelmäßigen Abständen gemessen. Zu keinem Zeitpunkt konnte eine Steigerung der PTG beobachtet werden. Während der ersten 8 min, d.h. zur Hälfte der PTG-Messung nach Muskarinzugabe, wurde sogar eine leichte Abnahme der PTG gemessen. Als nächste Konzentration wurde Muskarin 10^{-4} M eingesetzt. Bereits zum ersten Messpunkt 3 min nach Muskarinzugabe konnte eine Steigerung der PTG aller Partikel um im Mittel 111%, bei den gefilterten Partikeln mit $Q < 1,15$ um im Mittel 55% beobachtet werden. Der Maximalwert

wurde bei Messung aller Partikel 12 min nach Substanzzugabe mit einer Steigerung um im Mittel 150% erreicht. Bei Messung der gefilterten Partikel wurde eine maximale Steigerung der PTG um im Mittel 90% erreicht. Anhand dieser Austestung wurde in den späteren Versuchen Muskarin in einer Konzentration von 10^{-4} M eingesetzt (Abb. 31).

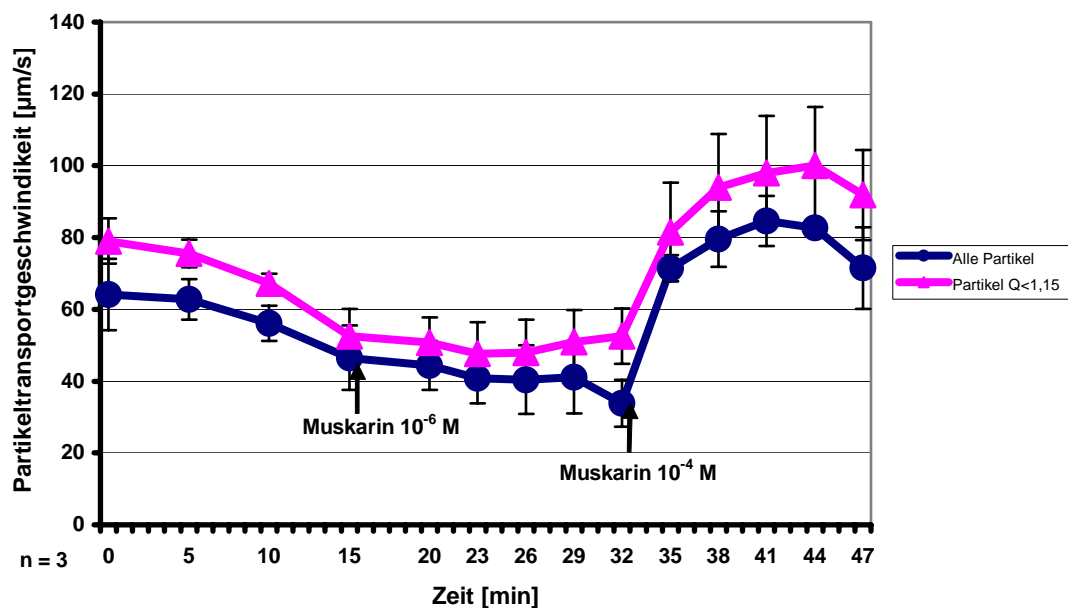


Abb.31: Austestung der Muskarinkonzentration.

Dargestellt sind die MW der PTG mit dazugehörigem SEM. Die Kurve mit Kreissymbolen zeigt die Werte aller transportierten Partikel. Die Kurve mit dreieckigen Symbolen zeigt nur solche Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen einem Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht ($Q < 1,15$).

4.2.1.2 Versuche zur spezifischen Fragestellung

4.2.1.2.1 PTG nach exogener Zugabe von Muskarin und ATP bei WT-Mäusen

Nach einem signifikanten Geschwindigkeitsabfall der transportierten Partikel über die ersten 15 min bewirkte die exogene Zugabe von Muskarin in einer Konzentration von 10^{-4} M eine signifikante Erhöhung der PTG (Abb. 32). Die

Geschwindigkeit der Partikel wurde nach Muskarinzugabe während der nächsten 17 min gemessen. Eine signifikante Erhöhung konnte bereits zum ersten Messpunkt nach 2 min festgestellt werden. Zum Zeitpunkt 8 min nach Muskarinzugabe betrug die Steigerung der Geschwindigkeit aller transportierten Partikel im Mittel 86%. Bei den Partikeln mit $Q < 1,15$ konnte zu diesem Zeitpunkt eine Steigerung von 78% gemessen werden. Die maximale Geschwindigkeit konnte bei beiden Messreihen (Reihe 1: MW aller Partikel, Reihe 2: MW solcher Partikel mit $Q < 1,15$) 14 min nach Substanzzugabe festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt konnte eine Steigerung durch Muskarinzugabe bei allen Partikeln im Mittel um 116% und bei den gefilterten Partikeln um 98% gemessen werden (Abb. 32). Die anschließende exogene ATP-Zugabe erbrachte bei der Messung aller Partikel keine Steigerung der PTG im Vergleich zur Maximalstimulation nach Muskarinzugabe, bei den gefilterten Partikel konnte eine Steigerung der PTG im Mittel um 2% erfasst werden. Im Vergleich zum letzten Wert der PTG nach Muskarinstimulation konnte die PTG allerdings bei allen Partikeln und bei Partikeln mit $Q < 1,15$ um im Mittel 11% nach ATP-Zugabe gesteigert werden (Abb. 32).

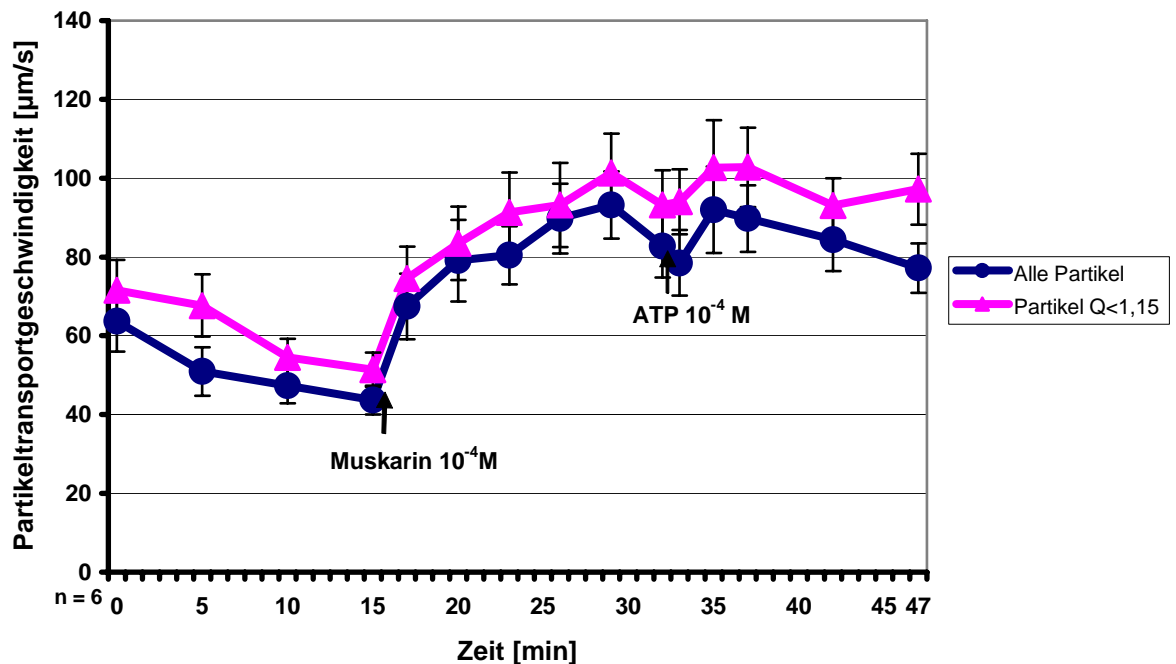


Abb. 32: PTG nach Zugabe von Muskarin gefolgt von ATP bei WT-Mäusen.

Die Kurve mit Kreissymbolen stellt die Geschwindigkeitsmessung aller transportierten Partikel dar. Die Kurve mit dreieckigen Symbolen zeigt nur solche Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen einem Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht ($Q < 1,15$).

4.2.1.2.2 PTG nach exogener Zugabe von Muskarin und ATP bei M1KO-Mäusen

Bei den M1KO-Mäusen wurde eine signifikante Abnahme der PTG zwischen dem Start der Messungen und dem Messpunkt nach 15 min Versuchsdauer erfasst (Abb. 33). Die anschließende exogene Zugabe von Muskarin zeigte während der ersten zwei folgenden Messungen keine signifikante Änderung der PTG, erst 8 min nach Muskarineinwirkung konnte eine signifikante Steigerung der PTG im Vergleich zur Geschwindigkeit vor Muskarinzugabe gemessen werden. Für alle transportierten Partikel wurde eine Steigerung um im Mittel 38% und für die gefilterten Partikel eine Steigerung um 60% gemessen. Die Steigerung aller

Partikel zur Messung 8 min nach Muskarineinwirkung stellte den Maximalwert der Geschwindigkeit dar, hingegen wurde dieser bei den gefilterten Partikeln durch eine Steigerung um im Mittel 95% zum Messpunkt nach 32 min Versuchsdauer festgestellt. Die folgende exogene Zufuhr von ATP erhöhte bei diesem Stamm die Geschwindigkeit der transportierten Partikel nochmals im Vergleich zur Maximalgeschwindigkeit nach Muskarinzugabe um 44% bzw. um 17% bei den gefilterten Partikeln (Abb. 33).

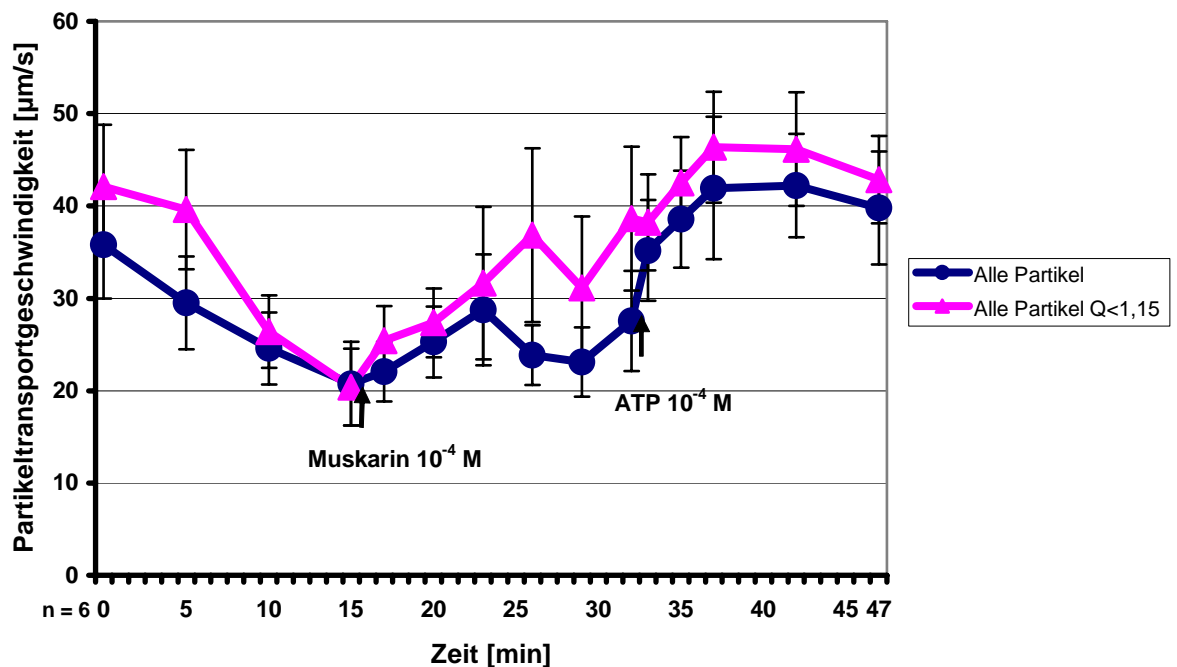


Abb. 33: PTG nach Zugabe von Muskarin gefolgt von ATP bei M1KO-Mäusen.

Die Kurve mit Kreissymbolen stellt die Geschwindigkeitsmessung aller transportierten Partikel dar. Die Kurve mit dreieckigen Symbolen zeigt nur solche Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen einem Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht ($Q < 1,15$).

4.2.1.2.3 PTG nach exogener Zugabe von Muskarin und ATP bei M2KO-Mäusen

Die M2KO-Tiere zeigten einen signifikanten Abfall der PTG während der ersten 15 min Versuchsdauer (Abb. 34). Nach erfolgter exogener Muskarinzugabe konnte bereits zum ersten folgenden Messpunkt eine signifikante Erhöhung der PTG nachgewiesen werden. 8 min nach Muskarinwirkung war die Maximalgeschwindigkeit mit einer Erhöhung der PTG um das 3fache (bei gefilterten Partikeln um das 2,8fache) des Ausgangswertes erreicht. Die kommende exogene ATP-Zufuhr konnte diesen Maximalwert um im Mittel 14% bei beiden Auswertekriterien erhöhen (Abb. 34).

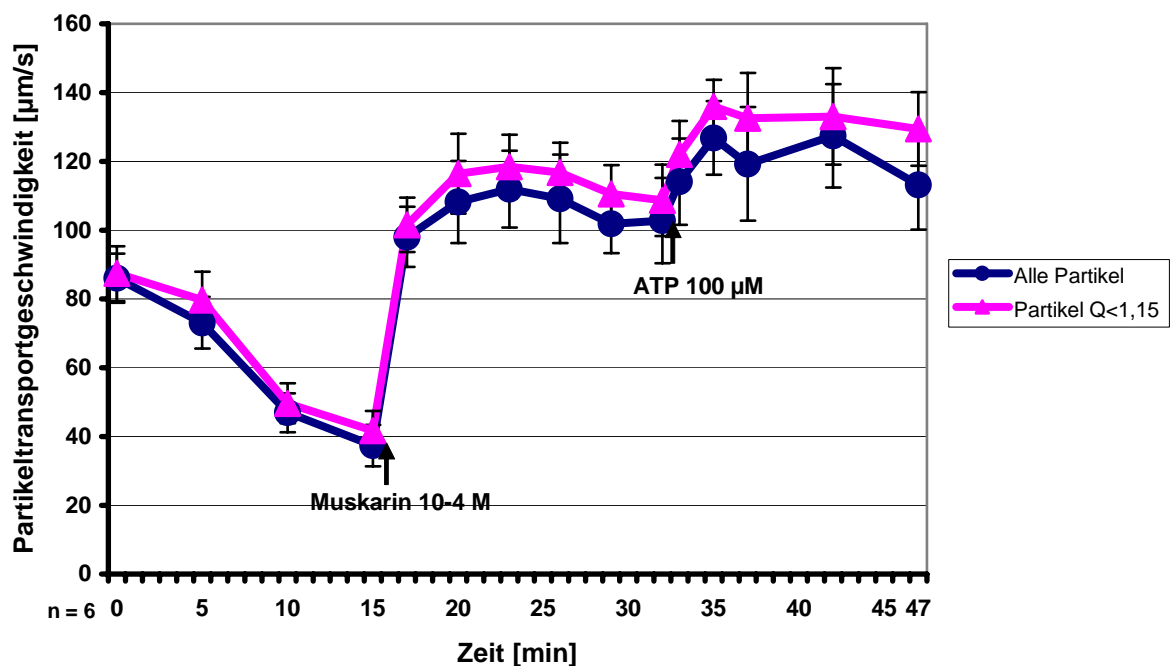


Abb. 34: PTG nach Zugabe von Muskarin gefolgt von ATP bei M2KO-Mäusen.

Die Kurve mit Kreissymbolen stellt die Geschwindigkeitsmessung aller transportierten Partikel dar. Die Kurve mit dreieckigen Symbolen zeigt nur solche Partikel, bei denen die zurückgelegte

Strecke zwischen einem Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht ($Q < 1,15$).

4.2.1.2.4 PTG nach exogener Zugabe von Muskarin und ATP bei M3KO-Mäusen

Die PTG der M3KO-Mäuse zeigte eine signifikante Abnahme innerhalb 15 min Versuchsdauer (Abb. 35). Bei diesem Stamm konnte auch eine exogene Zugabe von Muskarin eine weitere Abnahme der PTG nicht verhindern. Wurden alle transportierten Partikel in die MW-Berechnung mit einbezogen, konnte keine signifikante Geschwindigkeitsänderung nachgewiesen werden. Die PTG der Partikel mit $Q < 1,15$ jedoch zeigte eine signifikante Abnahme der Geschwindigkeit. Bereits 8 min nach Muskarinzugabe konnte eine Abnahme der Geschwindigkeit dieser Partikel um im Mittel -28% erfasst werden (Abb. 35). Die größte prozentuale Abnahme konnte bis zum Messpunkt 29 min errechnet werden. Sie betrug für die gefilterten Partikel im Mittel -42%. Die Geschwindigkeit war an vier Messpunkten derart erniedrigt, dass von jeweils einem der sechs Versuchstiere keine sich gerichtet bewegenden Partikel mehr erfasst werden konnten. Damit besaßen alle gemessenen Partikel einen Quotienten von $> 1,15$ und wurden somit nicht weiter ausgewertet. Die anschließende exogene Zugabe von ATP erbrachte bei beiden Versuchsbedingungen eine signifikante Steigerung der PTG. Die Steigerung der PTG aller transportierten Partikel betrug im Mittel 180%, bei den gefilterten Partikeln im Mittel 104% (Abb. 35).

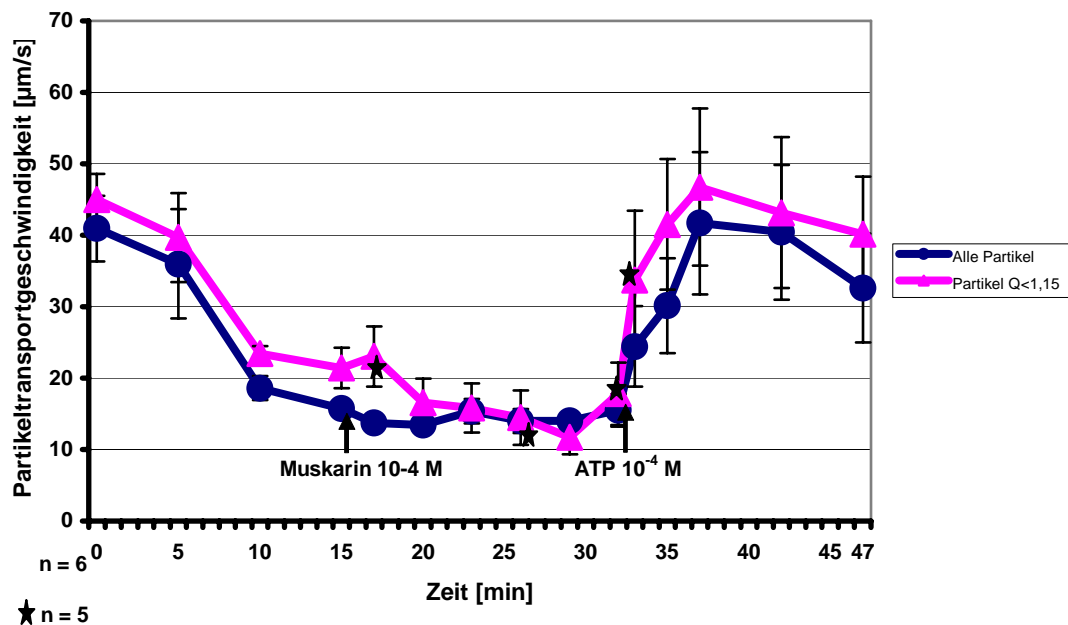


Abb. 35: PTG nach Zugabe von Muskarin gefolgt von ATP bei M3KO-Mäusen.

Die Kurve mit Kreissymbolen stellt die Geschwindigkeitsmessung aller transportierten Partikel dar. Die Kurve mit dreieckigen Symbolen zeigt nur solche Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen einem Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht ($Q < 1,15$).

4.2.1.2.5 PTG nach exogener Zugabe von Muskarin und ATP bei M2M3WT-Mäusen

Nach einer signifikanten Abnahme der Geschwindigkeit der transportierten Partikel beim Vergleich der Startgeschwindigkeit und der Geschwindigkeit nach 15 min Versuchsdauer, bewirkte die exogene Muskarinzugabe bei den M2M3WT-Mäusen bereits zum ersten folgenden Messpunkt eine signifikante Steigerung der Geschwindigkeit (Abb. 36). Die Messung der PTG aller Partikel ergab 8 min nach Zugabe von Muskarin ein Maximum der Geschwindigkeit. Die Geschwindigkeit war zu diesem Zeitpunkt im Vergleich vor der Substanzgabe um im Mittel 134% erhöht. Bei den gefilterten Partikeln wurde ein Maximum der PTG 14 min nach Muskarinzugabe mit einer Steigerung um 125% gemessen. Acht min nach Zugabe

von Muskarin wurde eine Steigerung um bereits 121% ermittelt. Die nachfolgende exogene Zufuhr von ATP konnte die PTG noch einmal um im Mittel 8% bei allen Partikeln und um 10% bei den gefilterten Partikeln steigern (Abb. 36).

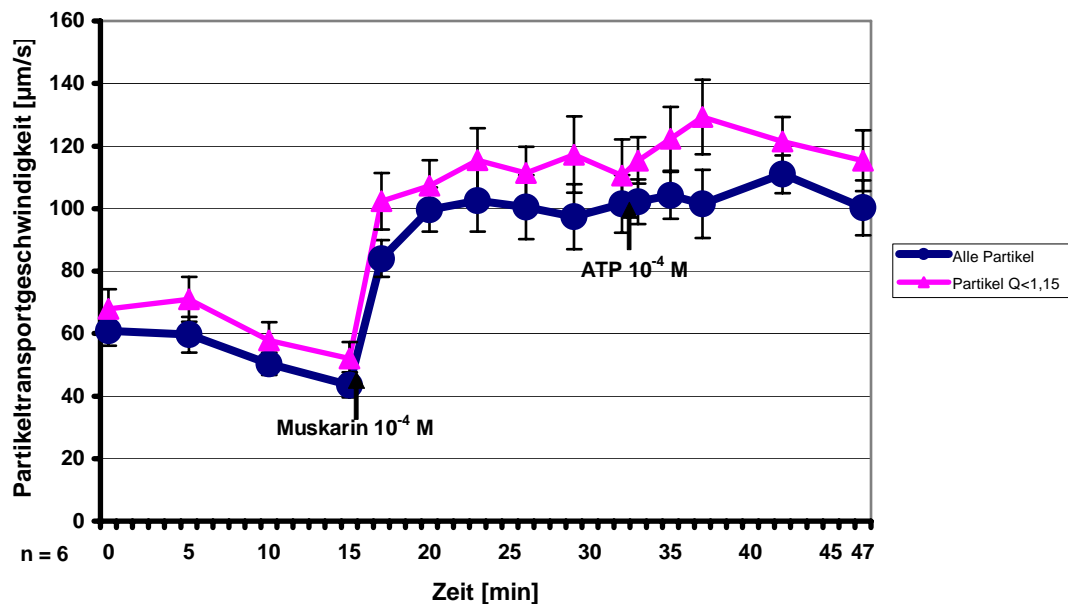


Abb. 36: PTG nach Zugabe von Muskarin gefolgt von ATP bei M2M3WT-Mäusen.

Die Kurve mit Kreissymbolen stellt die Geschwindigkeitsmessung aller transportierten Partikel dar. Die Kurve mit dreieckigen Symbolen zeigt nur solche Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen einem Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht ($Q < 1,15$).

4.2.1.2.6 PTG nach exogener Zugabe von Muskarin und ATP bei M2M3KO-Mäusen

Die gemessene PTG bei den M2M3KO-Tieren zeigte während der ersten 15 min Versuchsdauer einen signifikanten Abfall (Abb. 37). Die exogene Muskarinzugabe bewirkte eine signifikante Erhöhung der PTG bereits zum ersten Messzeitpunkt nach Substanzzugabe. Acht min nach Muskarinzugabe konnte eine

Steigerung der PTG um im Mittel 55% bei allen Partikeln und um im Mittel 39% bei gefilterten Partikeln gemessen werden. Die maximale Geschwindigkeit nach Muskarinzugabe konnte für beide Messreihen 14 min nach Substanzbeimischung errechnet werden. Sie lag für alle Partikel bei 82%, bei Partikeln mit definierter Wegstrecke bei 74%. Die anschließende Zugabe von ATP erbrachte in beiden Messreihen eine weitere Steigerung der PTG um im Mittel 46% (Abb. 37).

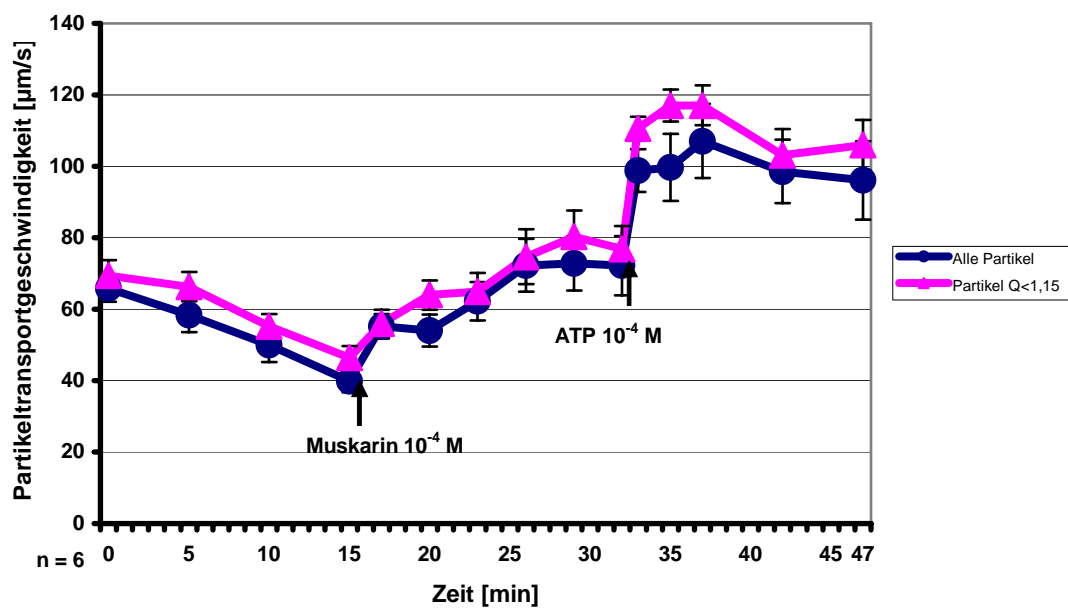


Abb. 37: PTG nach Zugabe von Muskarin gefolgt von ATP bei M2M3KO-Mäusen.

Die Kurve mit Kreissymbolen stellt die Geschwindigkeitsmessung aller transportierten Partikel dar. Die Kurve mit dreieckigen Symbolen zeigt nur solche Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen einem Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht ($Q < 1,15$).

4.2.1.2.7 Vergleich der PTG nach Muskarin- und ATP-Zugabe bei KO-Mäusen und ihrem korrespondierenden WT-Stamm (angegeben sind der MW von $n = 6$ Tieren und der SEM)

Startgeschwindigkeit

Zu Messbeginn ergab die PTG bei den WT-Mäusen einen Wert von $63,7 \pm 7,7 \mu\text{m/s}$. Diese Geschwindigkeit war nicht signifikant unterschiedlich zur Startgeschwindigkeit der M2KO-Tiere mit $86,1 \pm 7,1 \mu\text{m/s}$. Im Gegensatz dazu war die gemessene Geschwindigkeit der transportierten Partikel bei den M1KO-Tieren mit $35,8 \pm 5,8 \mu\text{m/s}$ und den M3KO-Tieren mit $40,9 \pm 4,6 \mu\text{m/s}$ im Vergleich zu ihrem WT-Stamm hoch signifikant erniedrigt (Abb. 38 und 39).

PTG nach 15 min Versuchsdauer

Nach 15 min Versuchsdauer lag der MW der PTG der WT-Tiere bei $43,7 \pm 3,6 \mu\text{m/s}$. Auch zu diesem Messpunkt zeigten die M1KO-Tiere mit $20,8 \pm 4,5 \mu\text{m/s}$ und die M3KO-Mäuse mit $15,8 \pm 0,8 \mu\text{m/s}$ im Vergleich zu ihrem WT-Stamm eine hoch signifikant erniedrigte Geschwindigkeit ihrer transportierten Partikel. Bei der Auswertung der PTG der M2KO-Tiere mit $37,3 \pm 6,1 \mu\text{m/s}$ wurde zu diesem Zeitpunkt kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen diesen KO-Tieren und den WT-Tieren festgestellt (Abb. 38 und 39).

PTG nach exogener Muskarinzugabe

Der erste MW der PTG bei den WT-Tieren nach Muskarinzugabe lag bei $67,5 \pm 8,3 \mu\text{m/s}$. Dort zeigten bereits alle KO-Stämme einen signifikanten Unterschied in ihrer PTG im Vergleich zu ihrem korrespondierenden WT-Stamm. Während die Geschwindigkeit der Partikel bei den M2KO-Tieren mit $98,0 \pm 8,7 \mu\text{m/s}$ hoch signifikant erhöht war, war die gemessene PTG bei den M1KO-Tieren mit $22,1 \pm 3,2 \mu\text{m/s}$ und den M3KO-Tieren mit $13,8 \pm 0,8 \mu\text{m/s}$ hoch signifikant erniedrigt. Acht min nach Muskarinzugabe war die PTG der M2KO-Tiere mit $111,9 \pm 11,1 \mu\text{m/s}$ signifikant erhöht im Vergleich zur PTG der WT-Mäuse mit $80,4 \pm 7,3 \mu\text{m/s}$. Weiterhin blieben die PTG der M1KO-Mäuse mit $28,8 \pm 6,0 \mu\text{m/s}$ und die der M3KO-Mäuse mit $15,4 \pm 1,7 \mu\text{m/s}$ hoch signifikant erniedrigt. Auch bei Maximalgeschwindigkeit nach Muskarinzugabe blieben die Werte der M1KO-Mäuse mit $28,8 \pm 6,0 \mu\text{m/s}$ und der M3KO-Tiere mit $15,5 \pm 2,3 \mu\text{m/s}$ im Vergleich zum korrespondierenden WT-Stamm mit einer

Maximalgeschwindigkeit von $93,2 \pm 8,6 \mu\text{m/s}$ hoch signifikant erniedrigt. Hingegen war bei den M2KO-Tieren mit einer PTG von $111,9 \pm 11,1 \mu\text{m/s}$ zu diesem Messpunkt kein signifikanter Unterschied zur PTG ihres WT-Stammes nachweisbar (Abb. 38 und 39).

PTG nach exogener ATP-Zugabe

Die Zugabe von ATP zeigte in ihrer Auswirkung auf die PTG signifikante Unterschiede zwischen dem WT-Stamm und allen getesteten KO-Stämmen. Dabei wurden die Werte 3 min nach ATP-Zugabe statistisch miteinander verglichen. Zu diesem Messpunkt lag bei den WT-Mäusen die Maximalgeschwindigkeit der Partikel mit $92,0 \pm 11,0 \mu\text{m/s}$. Die PTG der M2KO-Tiere mit $126,8 \pm 10,7 \mu\text{m/s}$ war signifikant erhöht im Vergleich zu ihrem WT-Stamm, die der M1KO-Tiere mit $38,6 \pm 5,3 \mu\text{m/s}$ und die der M3KO-Tiere mit $30,2 \pm 6,6 \mu\text{m/s}$ waren hoch signifikant erniedrigt (Abb. 38 und 39).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass während der gesamten Versuchsdauer die PTG der M1KO- und die der M3KO-Tiere im Vergleich zu ihrem WT-Stamm hoch signifikant erniedrigt blieben. Auch die Zugabe von Muskarin und ATP konnte die Geschwindigkeit nicht auf das Niveau des korrespondierenden WT-Stammes heben. Im Unterschied dazu zeigten die Geschwindigkeitsmessungen bei den M2KO-Tieren nach Substanzzugabe von Muskarin und ATP eine gesteigerte PTG im Vergleich zu ihrem WT-Stamm (Abb. 38 und 39).

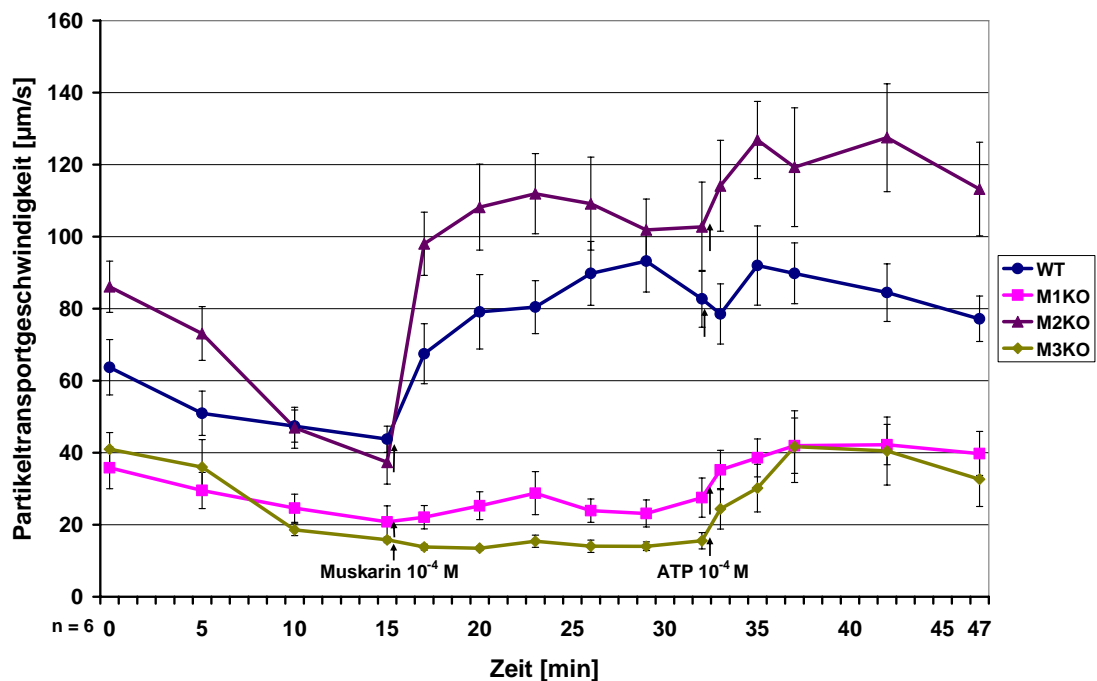


Abb. 38: Vergleichende Darstellung der PTG der getesteten KO-Stämmen und des korrespondierenden WT-Stammes nach Muskarin- und ATP-Zugabe.

Es werden die MW aus $n = 6$ Tieren mit SEM für jeden Stamm gezeigt. Zur besseren Übersicht sind die Kurven der Messergebnisse der gefilterten Partikel nicht eingefügt. Die Kurve mit Kreissymbolen zeigt die Ergebnisse des WT, die Kurve mit Rechtecksymbolen die der M1KO-Tiere. Die Kurve mit Dreiecksymbolen stellt die Ergebnisse der M2KO-Tiere und die Kurve mit Rautensymbolen die der M3KO-Tiere dar.

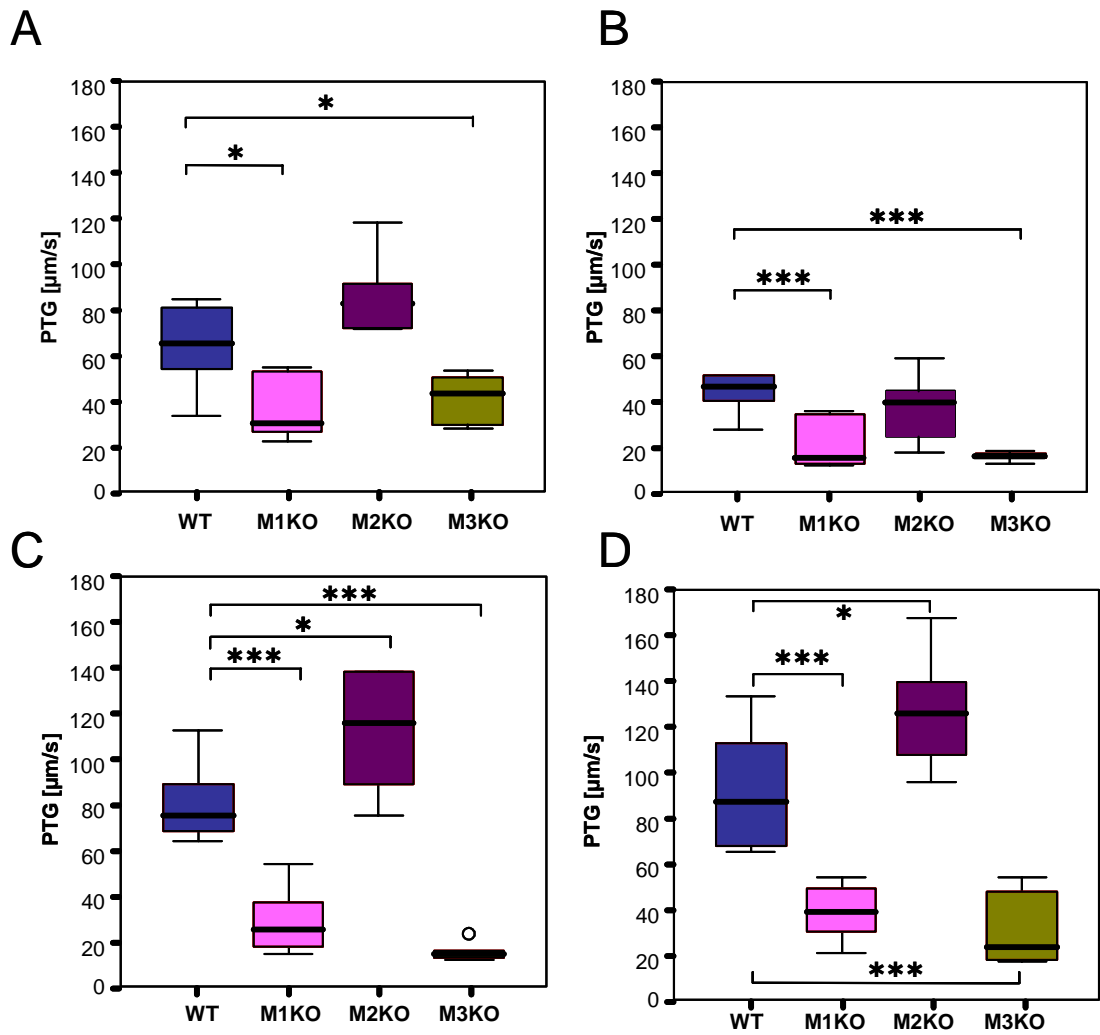


Abb. 39: Die Boxplots illustrieren die PTG in der Trachea der untersuchten KO-Stämme und in ihrem korrespondierenden WT-Stamm. Die Boxplots zeigen die 0, 25, 50, 75 und 100 Perzentile.

* = $p \leq 0,05$, *** = $p \leq 0,005$, ° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung

A) Vergleich Startgeschwindigkeit

B) Vergleich nach 15 min Äquilibrationzeit

C) Vergleich nach Muskarinzugabe (23 min nach Messbeginn)

D) Vergleich nach ATP-Zugabe (35min nach Messbeginn)

4.2.1.2.8 PTG nach Muskarin- und ATP-Zugabe bei M2M3KO-Mäusen und ihrem korrespondierenden M2M3WT-Stamm (angegeben ist der MW von $n = 6$ Tieren und der SEM)

Startgeschwindigkeit

Der Vergleich der PTG zu Messbeginn zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den M2M3KO-Tieren mit $65,8 \pm 3,8 \mu\text{m/s}$ und ihrem korrespondierenden WT-Stamm mit $60,9 \pm 4,9 \mu\text{m/s}$ (Abb. 40 und 41).

PTG nach 15 min Versuchsdauer

Der Vergleich der PTG nach 15 min Versuchsdauer erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen den M2M3KO-Tieren mit $39,8 \pm 4,7 \mu\text{m/s}$ und ihrem korrespondierenden WT-Stamm mit $43,5 \pm 4,0 \mu\text{m/s}$ (Abb. 40 und 41).

PTG nach exogener Muskarinzugabe

Die Messungen nach exogener Muskarinzugabe zeigten eine signifikante Erniedrigung der PTG bei den M2M3KO-Tieren mit $62,3 \pm 5,3 \mu\text{m/s}$ im Vergleich zu ihrem WT-Stamm mit einer PTG von $102,6 \pm 10,0 \mu\text{m/s}$ (Abb. 40 und 41).

PTG nach exogener ATP-Zugabe

Keinen signifikanten Unterschied zeigte die statistische Auswertung der PTG-Messungen zwischen den M2M3KO-Tieren mit $99,8 \pm 9,4 \mu\text{m/s}$ und ihrem WT-Stamm mit $104,3 \pm 7,5 \mu\text{m/s}$ nach exogener ATP-Zugabe (Abb. 40 und 41).

Zusammenfassend (siehe Abb. 42) zeigten die PTG-Messungen der M3KO-Tiere im Vergleich zum WT-Stamm vor und während Muskarinzugabe eine signifikant erniedrigte Geschwindigkeit. Auch eine exogene Zufuhr von ATP konnte die Geschwindigkeit nicht auf das Niveau des WT-Stammes heben. Sie blieb signifikant erniedrigt. Fehlten nun sowohl der M2- als auch der M3-Rezeptor, ergab die PTG-Messung vor jeglicher Substanzzugabe keinen Unterschied zum WT-Stamm. Nach Muskarinzugabe zeigte sich, dass die PTG der DoppelKO-Tiere nicht an die Geschwindigkeit des WT-Stammes heranreichte. Sie war signifikant erniedrigt. Erst nach exogener ATP-Zufuhr konnte wieder kein signifikanter Unterschied in der PTG zwischen diesen Tieren und ihrem WT-

Stamm festgestellt werden. Bei den M2KO-Tieren war die PTG nach Muskarin- und ATP-Zugabe signifikant gesteigert.

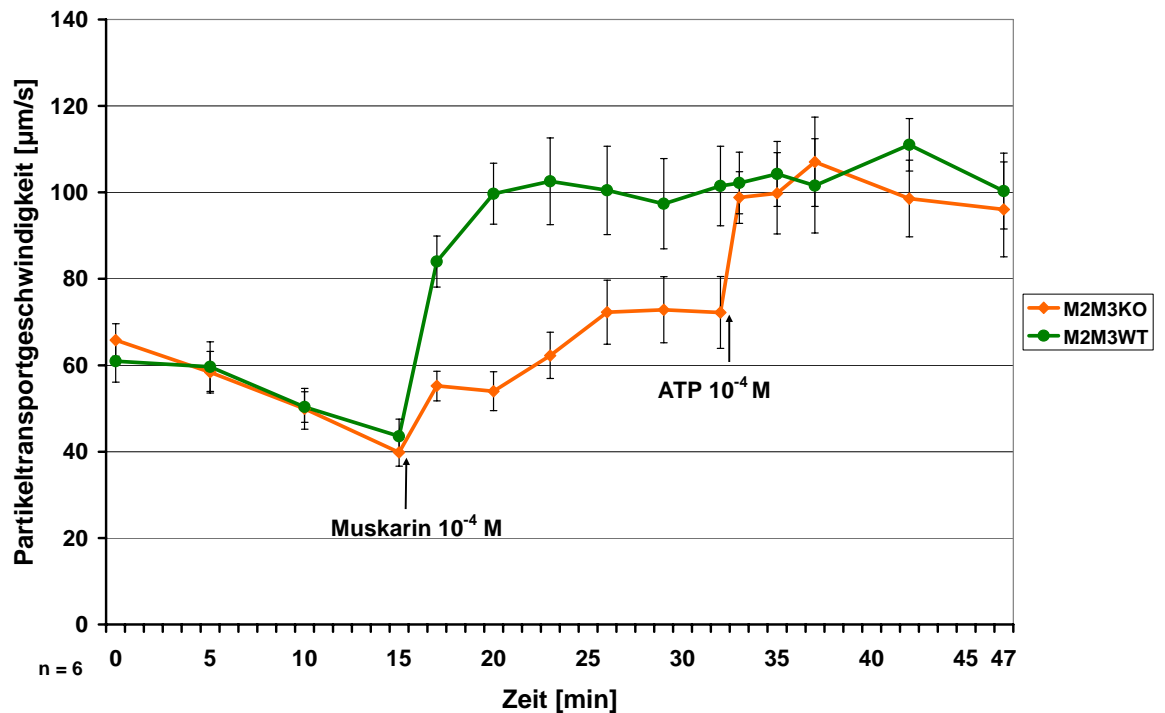


Abb. 40: Vergleichende Darstellung der PTG der M2M3KO-Tiere und des korrespondierenden WT nach Muskarin- und ATP-Zugabe.

Es werden die MW aus $n = 6$ Tieren mit SEM für jeden Stamm gezeigt. Zur besseren Übersicht sind die Kurven der Messergebnisse der gefilterten Partikel nicht eingefügt. Die Kurve mit Kreissymbolen zeigt die Ergebnisse des WT-Stammes, die Kurve mit Rautensymbolen die der M2M3KO-Tiere.

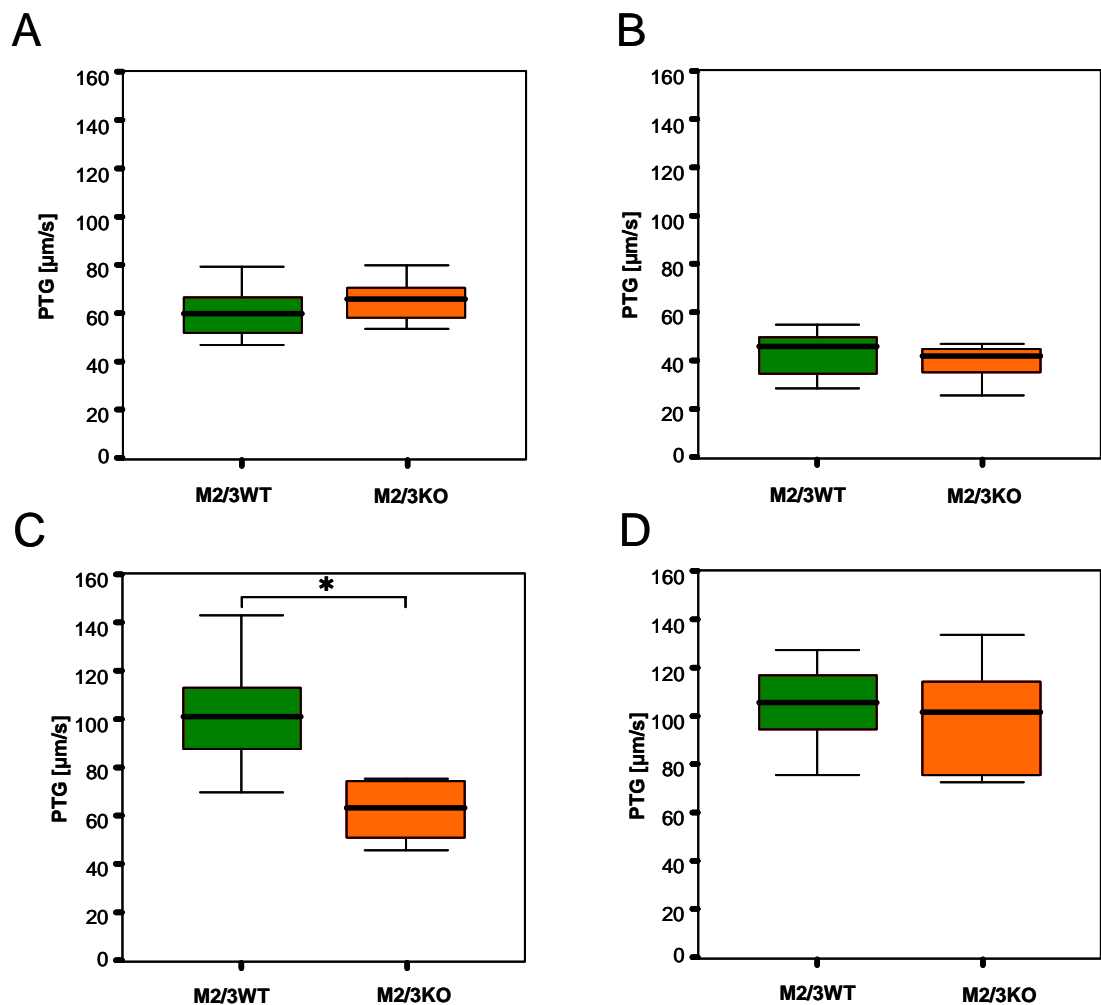


Abb. 41: Die Boxplots illustrieren die PTG der M2M3WT-Tiere im Vergleich zur PTG der M2M3KO-Tiere

Die Boxplots zeigen die 0, 25, 50, 75 und 100 Perzentile.

* = $p \leq 0,05$

A) Vergleich Startgeschwindigkeit

B) Vergleich nach 15 min Äquilibrationszeit

C) Vergleich nach Muskarinzugabe (23 min nach Messbeginn)

D) Vergleich nach ATP-Zugabe (35 min nach Messbeginn)

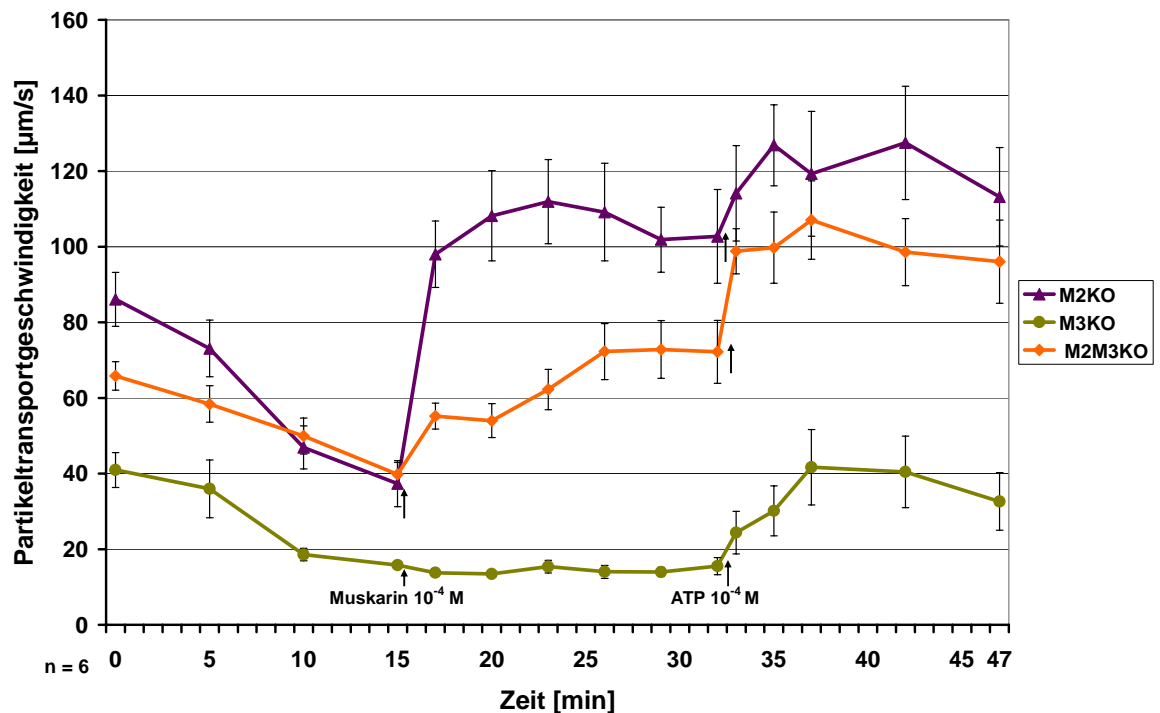


Abb. 42: Vergleichende Darstellung der PTG der M2M3KO-Tiere, der M3KO-Tiere und der M2KO-Tiere nach Muskarin- und ATP-Zugabe.

Es werden die MW aus $n = 6$ Tieren mit SEM für jeden Stamm gezeigt. Zur besseren Übersicht sind die Kurven der Messergebnisse der gefilterten Partikel nicht eingefügt. Die Kurve mit Rautensymbolen zeigt die Ergebnisse der M2M3KO-Tiere, die Kurve mit Kreissymbolen die der M3KO-Tiere und die Kurve mit Dreiecksymbolen die Werte der PTG bei M2KO-Tieren.

4.2.1.2.9 Zugabe von Atropin vor Muskarin- und ATP-Zugabe

Für alle Versuche wurde Atropin in einer Konzentration von 10^{-6} M eingesetzt (Abb. 43).

Die Zugabe von Atropin verhinderte den Muskarin-induzierten Anstieg der PTG. Bei den getesteten M1KO-, M3KO-, M2M3KO-Tieren und dem WT-Stamm konnte kein signifikanter Unterschied in der PTG nach exogener Muskarinzugabe im Vergleich zur PTG vor Muskarinzugabe festgestellt werden (Abb. 43). Die anschließende Gabe von ATP steigerte die PTG der WT-Tiere um das 3,7fache im Vergleich zur Geschwindigkeitsmessung vor ATP-Zugabe. Die PTG in den KO-Stämmen wurden bei den M1KO-Tieren um das 2,7fache, bei den M3KO-Tieren um das 3fache und bei den M2M3KO-Tieren um das 4,7fache gesteigert. Mit der

erreichten Maximalgeschwindigkeit von im Mittel $90,1 \mu\text{m/s} \pm 8,5 \mu\text{m/s}$ bei den WT-Mäusen wurde eine sehr ähnliche Geschwindigkeit wie im Versuchsverlauf ATP-Gabe ohne vorherige Atropinzufuhr gemessen ($91,98 \mu\text{m/s} \pm 11,0 \mu\text{m/s}$). Auch bei den M1KO-Tieren veränderte die vorherige Atropingabe die Maximalgeschwindigkeit nach ATP-Zufuhr nur minimal. Mit Atropingabe ergab sich eine Geschwindigkeit von im Mittel bei $41,2 \mu\text{m/s} \pm 7,6 \mu\text{m/s}$ im Vergleich zu einer Geschwindigkeit ohne vorherige Atropingabe von im Mittel um $42,20 \mu\text{m/s} \pm 5,6 \mu\text{m/s}$. Die Geschwindigkeit der M2M3KO-Tiere nach vorheriger Atropingabe unterschied sich mit im Mittel erreichten $90,8 \mu\text{m/s} \pm 9,7 \mu\text{m/s}$ SEM von den ohne Atropin erreichten $107,1 \mu\text{m/s} \pm 9,7 \mu\text{m/s}$. Der größte Unterschied aber wurde bei den M3KO-Tieren mit einer Maximalgeschwindigkeit nach ATP-Zugabe ohne vorherige Atropinzufuhr von im Mittel $41,7 \pm 10,0 \mu\text{m/s}$ und einer Maximalgeschwindigkeit nach ATP-Zugabe mit vorheriger Atropinzufuhr von im Mittel $81,3 \pm 12,4 \mu\text{m/s}$ gemessen (Abb. 43).

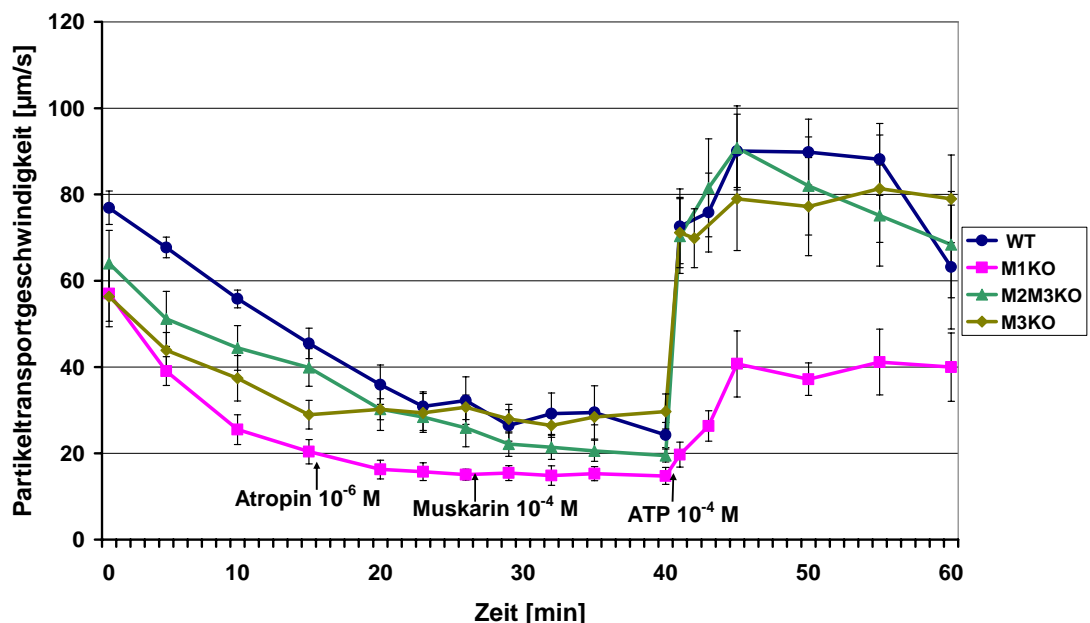


Abb. 43: Vergleichende Darstellung der PTG der WT-Mäuse, der M1KO-Mäuse, der M3KO-Mäuse und der M2M3KO-Mäuse nach Atropinzugabe, gefolgt von einer Muskarin- und ATP-Zugabe.

Es werden die MW aus $n = 6$ Tieren mit SEM für jeden Stamm gezeigt. Zur besseren Übersicht sind die Kurven der Messergebnisse der gefilterten Partikel nicht eingefügt. Die Kurve mit Kreissymbolen zeigt die Ergebnisse des WT-Stammes, die Kurve mit Rechtecksymbolen die der M1KO-Tiere. Die Kurve mit Rautensymbolen zeigt die Werte der M3KO-Tiere und die Kurve mit Dreiecksymbolen die Ergebnisse der M2M3KO-Tiere.

4.2.2 Zilienschlagfrequenz in der Trachea bei MR KO-Mäusen und ihrem korrespondierenden WT-Stamm

Die Frequenzen werden in Hz, Mittelwert \pm SEM angegeben.

4.2.2.1 Startfrequenz

Die Messung der Zilienschlagfrequenz (ZSF) der WT-Mäuse zu Versuchsbeginn ergab einen Wert von $15,8 \pm 0,5$ Hz. Diese Startfrequenz zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Startfrequenz der M1KO-Tiere mit einem Wert von $14,9 \pm 0,4$ Hz. Die Frequenz der M2KO-Tiere mit $12,7 \pm 0,5$ Hz und die Frequenz der M3KO-Tiere mit $13,4 \pm 0,5$ Hz waren im Vergleich zur Startfrequenz der WT-Tiere signifikant erniedrigt (Abb. 44 und 45).

4.2.2.2 Zilienschlagfrequenz nach 15 min Versuchsdauer (Äquilibrationsphase)

Bei allen eingesetzten Mäusestämmen zeigte die Messung nach 15 min Versuchsverlauf eine signifikante Abnahme der ZSF im Vergleich zu ihrer Startfrequenz. Die Frequenz bei den WT-Mäusen nahm um im Mittel 24% ab, während die Messungen der M1KO-Mäuse eine um im Mittel 34% und die der M2KO-Mäuse eine um im Mittel 38% starke Frequenzabnahme verzeichneten. Mit einer Abnahme im Mittel um 42% bei den M3KO-Mäusen auf eine Frequenz von $7,7 \pm 0,5$ Hz konnte die größte Abnahme der ZSF nach 15 min Versuchsdauer festgestellt werden. Zu diesem Messpunkt konnte für alle KO-Stämme im Vergleich zu dem WT-Stamm ein signifikanter Unterschied in der ZSF festgestellt werden. Die WT-Tiere zeigten mit $11,9 \pm 0,6$ Hz die höchste Schlagfrequenz, in absteigender Reihenfolge gefolgt von den M1KO-Tieren mit $9,80 \pm 0,36$ Hz, den M2KO-Tieren mit $7,78 \pm 0,40$ Hz und schlussendlich den M3KO-Tieren mit $7,70 \pm 0,46$ Hz (Abb. 44 und 45).

4.2.2.3 Zilienschlagfrequenz nach Muskarinzugabe

Die Zugabe von Muskarin bewirkte bei den WT-Tieren, bei den M1KO- und bei den M2KO-Mäusen eine signifikante Erhöhung der ZSF. Bei den WT-Mäusen konnte eine Steigerung der Frequenz im Mittel um 75% auf eine Frequenz von $20,8 \pm 0,8$ Hz erreicht werden. Bei den M1KO-Mäusen zeigte sich eine

Steigerung um im Mittel 102% auf eine Frequenz von $19,8 \pm 0,7$ Hz, die von einer Steigerung im Mittel um 152% von den M2KO-Mäusen auf eine Frequenz von $19,6 \pm 0,9$ Hz noch übertroffen wurde. Fehlte jedoch der M3-Rezeptor, konnte durch Zugabe von Muskarin keine Stimulation der Zilienschlagfrequenz erreicht werden. Diese M3KO-Mäuse zeigten zum Messzeitpunkt sogar einen Rückgang der Schlagfrequenz um im Mittel -3,9%. Damit verringerte sich die Frequenz des Zilienschlages von $7,7 \pm 0,5$ Hz auf $7,4 \pm 0,8$ Hz.

Der Vergleich der Stämme miteinander zeigte nach Zugabe von Muskarin keinen signifikanten Unterschied zwischen der Frequenz der WT-, der Frequenz der M1KO- und der Frequenz der M2KO-Tiere. Die Frequenz der M3KO-Tiere war im Vergleich zum korrespondierenden WT-Stamm hoch signifikant erniedrigt (Abb. 44 und 45).

4.2.2.4 Zilienschlagfrequenz nach ATP-Zugabe

Die Zugabe von ATP nach vorheriger Muskarinzugabe brachte bei allen Stämmen eine signifikante Erhöhung der ZSF. Bei dem WT-Stamm konnte eine Erhöhung um im Mittel von 43% auf eine Frequenz von $29,9 \pm 0,5$ Hz erreicht werden. Die Erhöhung der Zilienschlagfrequenz bei den M1KO-Mäusen mit im Mittel um 11% auf eine Frequenz von $22,1 \pm 0,8$ Hz und den M2KO-Mäusen mit einer Erhöhung von im Mittel 21% auf eine Frequenz von $23,9 \pm 0,8$ Hz fiel deutlich geringer aus. Die M3KO-Tiere zeigten einen Anstieg der Frequenz um im Mittel 136% auf einen Wert von $17,5 \pm 1,3$ Hz.

Der Vergleich der Frequenz der KO-Stämme mit der des WT-Stammes zeigte einen signifikanten Unterschied zu allen getesteten KO-Stämmen. Die Frequenz der WT-Mäuse war signifikant höher als, in absteigender Reihenfolge, die der M2KO-, die der M1KO- und die der M3KO-Tiere (Abb. 44 und 45).

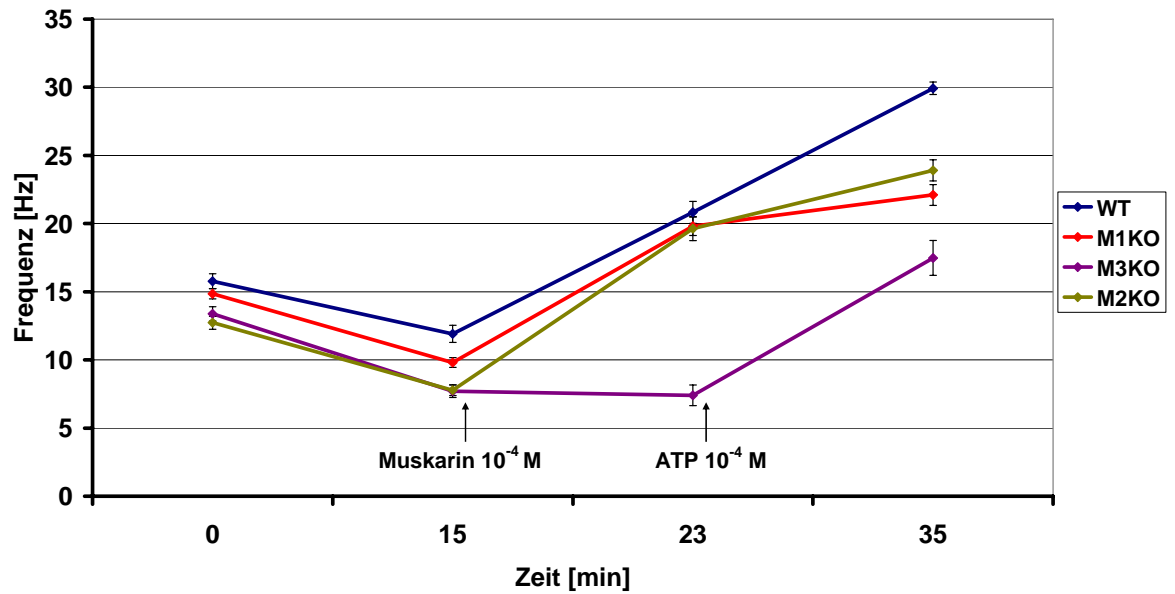


Abb. 44: Zilienschlagfrequenzmessung bei den KO-Stämmen und ihrem korrespondierenden WT-Stamm.

Gezeigt werden die MW und die SEM aus den Messungen von $n = 4$ Tieren. Pro Tier und Messpunkt wurde der MW und SEM aus 10 zilientragenden Zellen ermittelt. Die Signifikanzen werden in Abb. 45 dargestellt.

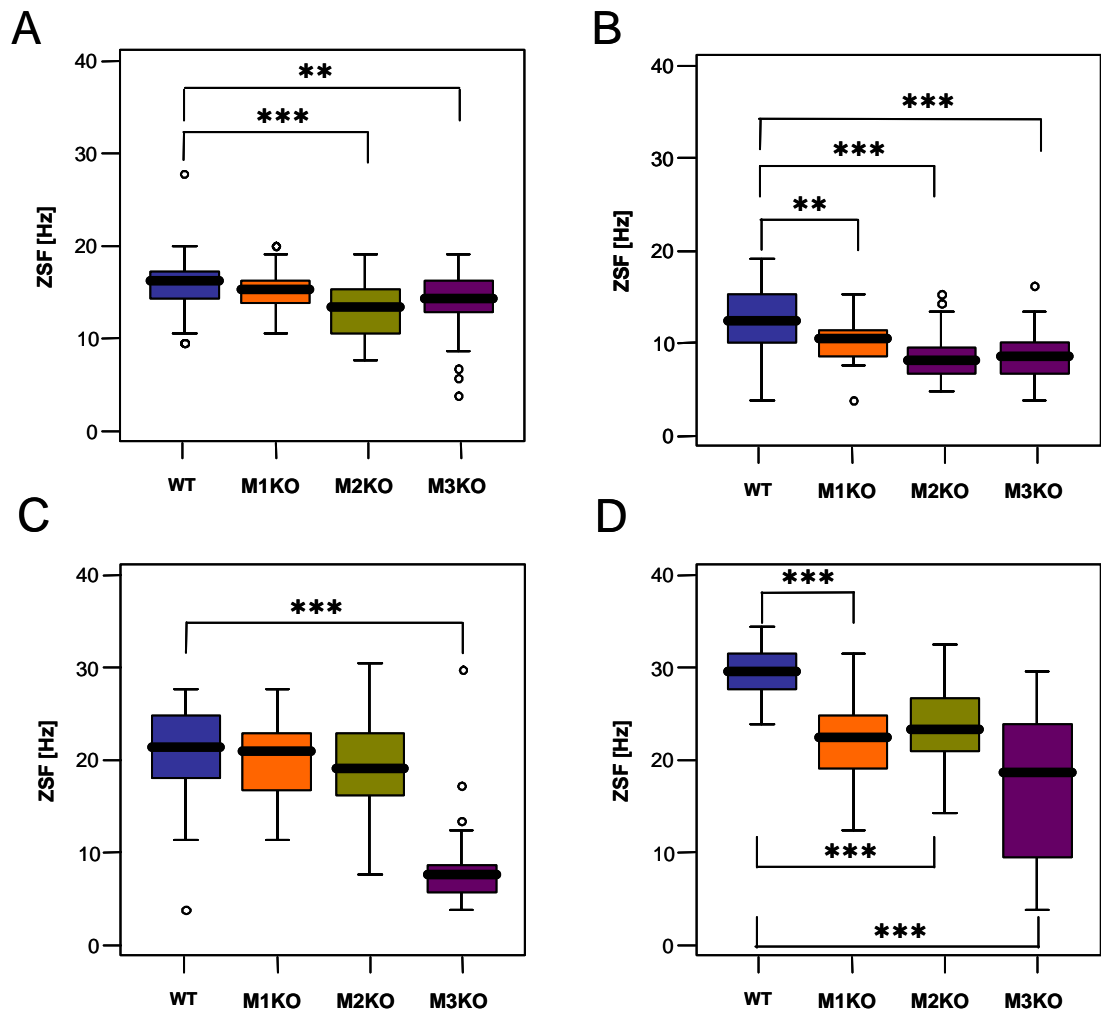


Abb. 45: Die Boxplots illustrieren die ZSF der untersuchten KO-Stämme im Vergleich zu ihrem korrespondierenden WT-Stamm.

Die Boxplots zeigen die 0, 25, 50, 75 und 100 Perzentile.

** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,005$, ° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung

A) Vergleich Startgeschwindigkeit

B) Vergleich nach 15 min Äquilierungszeit

C) Vergleich nach Muskarinzugabe (23 min nach Messbeginn)

D) Vergleich nach ATP-Zugabe (35 min nach Messbeginn)

4.2.3 Untersuchung zur Richtung des Partikeltransportes

Die Beobachtung der Partikeltransportrichtung bei den WT- und den M3KO-Mäusen zeigte in der Hälfte der untersuchten Tiere einen konstanten Strom der transportierten Dynabeadpartikel über die gesamte Länge der Trachea. Es konnte

keine abrupte Änderung der Transportrichtung oder Verwirbelungen der Partikel festgestellt werden (Tab. 14). In der anderen Hälfte der untersuchten Tiere konnten in verschiedener Anzahl Stellen beobachtet werden, in denen die Partikel durch den Zilienschlag ungeordnet und ungerichtet im Kreis geschlagen wurden, so dass sich mit zunehmender Anzahl von Polystyrenkügelchen immer größer werdende Partikelwirbel bildeten. Diese Verwirbelungen konnten keiner bestimmten Lokalisation in der Trachea zugeordnet werden, sondern sie waren wahllos über die gesamte Länge der Trachea verteilt. Bei der Untersuchung der M1KO-Tiere zeigten sich, außer in einem Tier, vermehrt Stellen, über denen kein gerichteter Transport zu erkennen war (Tab. 14). Die Partikel wurden ebenfalls wie oben beschrieben durch den Zilienschlag ungeordnet oder im Kreis bewegt. In Aufsichtsaufnahmen auf die Epitheloberfläche konnte bei diesen Tieren an den beschriebenen Stellen Wirbelbildungen der zilientragenden Zellen beobachtet werden (Abb. 46). Bei zwei Tieren konnte neben den beschriebenen Verwirbelungen Stellen beobachtet werden, bei denen der gerichtete Transport unterbrochen wurde und die Polystyrenpartikel wie an einer Weggabelung nach rechts und links weiter transportiert wurden. Teilweise wurden die Partikel fast um 180° zurück entgegen des restlichen Partikelstromes geschlagen (Tab. 14). Bei allen M1KO-Mäusen konnte neben den Störungen der Transportrichtung weite Strecken mit ungestörter Partikelflussrichtung beobachtet werden. In den untersuchten M2M3KO-Mäusen und ihrem korrespondierenden WT-Stamm konnte bei keinem Tier eine Unterbrechung des geordneten und gerichteten Transports beobachtet werden (Tab. 14).

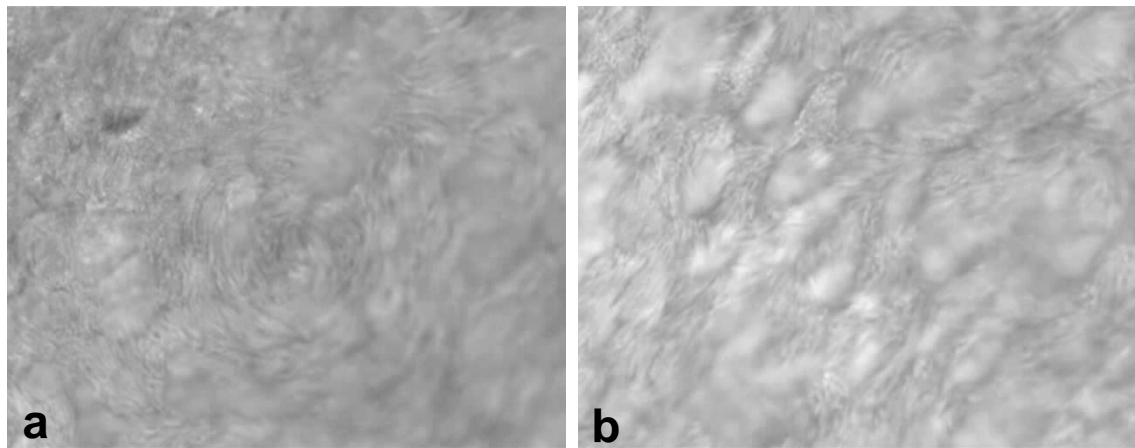


Abb. 46: Aufsicht auf das Trachealepithel und die zilientragenden Zellen in einem M1KO-Tier

- a) Wirbelbildung der zilientragenden Zellen
b) Lineare Anordnung der zilientragenden Zellen

	M1M3WT	M1KO	M3KO	M2M3WT	M2M3KO
Tier 1	0	4	0	0	0
Tier 2	0	5	0	0	0
Tier 3	0	1 (2-3)	0	0	0
Tier 4	2	1	0	0	0
Tier 5	4	0	5	0	0
Tier 6	1	2 (1)	0	0	0

Tab. 14: Tabellarische Übersicht über die qualitative Untersuchung zur Richtung des Partikeltransportes. Die Werte bezeichnen die Anzahl der Wirbelbildungen über die Gesamtlänge der Trachea. In Klammern wird die Anzahl der abrupten Richtungsänderungen der Partikel ohne Wirbelbildung in der Trachea angegeben. Es wurden von allen Stämmen n = 6 Tiere getestet.

5 Diskussion

5.1 Einfluss der M1, M2 und M3 Rezeptorsubtypen auf die Morphologie des Trachealepithels

Zahlreiche Veröffentlichungen stellen die große Bedeutung der MR für die Epithelmorphologie heraus. Für humanes Atemwegsepithel beschreiben Wessler und Kirkpatrick (2001a) einen Einfluss von MR insbesondere auf die Proliferation, Differenzierung, Organisation des Zytoskeletts und Ausbildung der Zell-Zellkontakte. Eglen et al. (2006) sehen die Funktion der MR in der Kontrolle der embryologischen Entwicklung von Epithelgewebe und in der Kontrolle des Zellwachstums und Proliferation von Epithelzellen. Bei pharmakologischen Untersuchungen an einer Tumorzelllinie des Brustgewebes zeigen Rimmaudo et al. (2005) den stimulierenden Einfluss von MR, vorrangig der M1 und M3 Rezeptorsubtypen, ebenfalls auf die Zellproliferation und die Angiogenese. Während die genannten Autoren meist verschiedene Subtypen an den zellulären Prozessen beteiligt sehen, beschreiben Metzen et al. (2003) anhand pharmakologischer Studien am respiratorischen Epithel der Ratte die tragende Rolle des M1 Rezeptors bei der Proliferation. Die Schwierigkeit pharmakologischer Untersuchungen zur speziellen Bedeutung einzelner Rezeptorsubtypen liegt jedoch in der mangelnden Selektivität der eingesetzten Agonisten und Antagonisten. Bis heute gibt es keine Pharmaka mit einer 100%igen Selektivität. Im Gegensatz dazu zeigen die hier aufgrund der Verwendung von MR KO-Tieren erbrachten Ergebnisse genau die spezifische Rolle der einzelnen Rezeptorsubtypen. Da bei diesen Tieren das jeweilige Gen zur Rezeptorbildung lebenslang ausgeschaltet ist, kann aufgrund des Ausbleibens bestimmter zellulärer Komponenten gezielt auf die Wirkung des einzelnen Subtypen geschlossen werden.

Die Bedeutung der einzelnen MR für die Zellproliferation und Zelldifferenzierung wurde anhand des Vergleiches der relativen Häufigkeit der verschiedenen Trachealzelltypen in den KO-Stämmen und dem korrespondierenden WT-Stamm ermittelt. Es konnten keine Unterschiede in der relativen Häufigkeit zilientragender Zellen, nicht-zilientragender Zellen und Basalzellen in allen getesteten KO-Stämmen und deren korrespondierenden WT-Stämmen gefunden

werden. Diese Ergebnisse galten für die gesamte Länge der Trachea und für das getrennt voneinander untersuchte Epithel über den Knorpelspangen, dem Musculus trachealis und dem Bandteil der Trachea. Um die Differenzierung nicht-zilientragender Zellen weiter aufzuschlüsseln, wurden immunhistochemisch markierte Bürsten- und neuroendokrine Zellen am Trachealquerschnitt ausgezählt. Die Ergebnisse zeigten im zervikalen und thorakalen Trachealabschnitt keine Unterschiede in der Anzahl der Bürstenzellen in allen getesteten KO-Tieren und dem korrespondierenden WT-Stamm. Die Anzahl immunreaktiver neuroendokriner Zellen in M1KO-Tieren war im zervikalen Teilabschnitt im Vergleich zum WT-Stamm signifikant erhöht, die Anzahl neuroendokriner Zellen im thorakalen Trachealabschnitt jedoch nicht. Diese Befunde könnten einen lokalen Einfluss des M1 Rezeptores auf die Zellproliferation und Zelldifferenzierung zeigen. In ihrer Arbeit von 2003 beschreiben Metzen et al. die tragende Rolle des M1 Rezeptors bei der Proliferation. Möglicherweise bewirkt sein Fehlen eine zumindest lokale Veränderung der Proliferation, die sich in der hier vorgefundenen Abweichung in der Anzahl neuroendokriner Zellen äußert. Die Anzahl der neuroendokrinen Zellen bei Defizienz des M2 oder des M3 Rezeptors unterschied sich nicht von der Anzahl neuroendokriner Zellen im WT-Stamm, so dass bisher kein Einfluss der untersuchten M2 und M3 Rezeptoren auf die Zellproliferation und Zelldifferenzierung des Trachealepithels festgestellt werden konnte.

Um mögliche subtilere Auswirkungen auf die Entwicklung und Differenzierung der trachealen Morphologie aufzudecken, wurde elektronenmikroskopisch die Ultrastruktur der zilientragenden Zelle, der sekretorischen und endokrinen Zelle, der Bürstenzelle und der Basalzelle untersucht. Die Ausbildung der Zell-Zellkontakte wurde zwischen zilientragenden Zellen, zwischen nicht-zilientragenden Zellen und zwischen einer nicht-zilientragenden und einer zilientragenden Zelle ebenfalls elektronenmikroskopisch untersucht. Bei keinem der untersuchten KO-Stämme traten Veränderungen in der Zellmorphologie der einzelnen Zelltypen und in der Ausbildung von Zell-Zellkontakten auf.

Im Trachealepithel erfüllt der physiologisch ablaufende Zilienschlag wichtige Aufgaben. Wie von Rott (1979) beschrieben, besitzen Patienten mit dem sogenannten Kartagener- oder Immotilitäts-Syndrom zilientragende Zellen im

Trachealepithel, die aber aufgrund einer abnormalen Zilienstruktur einen fehlerhaften Zilienschlag ausführen. Die abnormale Ultrastruktur stellt sich in fehlerhaft ausgebildeten Dyneinärmchen dar, die elektronenmikroskopisch sichtbar werden. Um den Einfluss von MR auf die Ausbildung und Differenzierung der Zilien genauer zu untersuchen, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Es konnte keine Veränderungen in der Zilienstruktur, weder im Zilienlängs- noch im –querschnitt, bei allen untersuchten KO-Tieren im Vergleich zu ihrem korrespondierenden WT-Stamm festgestellt werden. So kann in all den hier durchgeführten morphologischen Untersuchungen ein Einfluss der M2 und M3 Subtypen auf die Morphologie des Trachealepithels in den untersuchten Punkten nicht bestätigt werden. Die Defizienz des M1 Subtyps äußerte sich in den oben genannten lokalen Veränderungen. Wenn doch der Einfluss MR auf die Morphologie des Epithels zahlreich beschrieben ist, warum ergaben sich nur geringe morphologische Veränderungen? Der Grund für die doch insgesamt nur sehr geringen hier vorgefunden morphologischen Veränderungen liegt möglicherweise in der hohen Spezifität der aufgrund des Einsatzes von KO-Tieren durchgeführten Versuche im Vergleich zu den früher durchgeführten pharmakologischen Testungen. Vielleicht wären in MR Doppel-KO-Mäusen morphologischen Veränderungen sichtbar gewesen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sich ein differenziertes zilientragendes Trachealepithel auch in Abwesenheit der M1, M2 und M3 Rezeptorsubtypen entwickelt.

5.2 Verteilung zilientragender Zellen in der Trachea der Maus

Hamster (Gabridge et al. 1977), Ratte (Oliveira et al. 2003) und Mensch (Rhodin 1966) weisen eine inhomogene Verteilung der zilientragenden Zellen in der Trachea auf. Auch in Studien am Trachealepithel der Maus beschreiben Pack et al. (1980) eine ungleiche Verteilung der zilientragenden Zellen. Die bisher erhobenen Befunde gelten aber nur für verschiedene Trachealabschnitte und berücksichtigen nicht die Lage des Epithels innerhalb der Trachea. In der Angabe über die Häufigkeit der verschiedenen Zelltypen unterscheiden Pavelka et al. (1976) keine verschiedene Lokalisationen des Trachealepithels, so dass insgesamt die bisher erhobenen Befunde zur Verteilung der verschiedenen Zelltypen im

Trachealepithel der Maus nicht ausreichend sind. In den hier durchgeführten Auszählungen wurden mehrere Gesichtspunkte berücksichtigt. Neben Vergleichen der zervikalen und thorakalen Trachealabschnitte wurde jeweils noch das Epithel über dem Knorpel-, dem Band- und dem Muskelteil getrennt voneinander untersucht. Die in allen KO-Stämmen und in den korrespondierenden WT-Stämmen gezählten Zellen zeigten keinen Unterschied im Vergleich zervikalem zu thorakalem Trachealabschnitt. Bei allen war die Zahl der zilientragenden Zellen im Epithel über dem Muskel- und Bandteil signifikant erhöht im Vergleich zum Epithel über dem Knorpelteil. Diese Befunde zeigten einen wichtigen Ansatz für funktionelle Testungen am Trachealepithel, wie am Beispiel der PTG-Messung dargestellt. Um eine gute Vergleichbarkeit für die Messung der PTG in den unterschiedlichen Stämmen zu gewährleisten, wurde für jede Geschwindigkeitsmessung ein Bereich zwischen den Knorpelspangen gewählt. Mit dieser Auswahl wurde eine Beeinflussung der Geschwindigkeit durch Messungen in Bereichen mit unterschiedlicher Anzahl zilientragender Zellen, wie sie im Epithel über den Knorpelspangen im Unterschied zum Epithel über dem Band- und Muskelteil vorkommen, verhindert.

5.3 Methode zur Messung der effektiven ziliären Transportleistung

Ein effektiver ziliärer Partikeltransport in der Trachea ist von vielen Faktoren abhängig. In ihrem Übersichtsartikel über die MC fassen Wanner et al. (1996) die wesentlichen Parameter zusammen. Neben der ZSF spielen demnach ein physiologisch ablaufender Zilienschlag und die Koordination innerhalb einer zilientragenden Zelle und zwischen den zilientragenden Zellen eine große Rolle. Mit dem hier etablierten Messsystem können das Gesamtergebn und die ZSF berücksichtigt und gemessen werden. Bei den meisten bisher eingesetzten Messsystemen kann die ziliäre Funktion nicht getrennt von der auf ihr liegenden Mukusschicht betrachtet werden (Connolly et al. 1978, Velasquez und Morrow 1984; Foster et al. 2001). So ist es schwierig, die Bedeutung der einzelnen Rezeptorsubtypen für die oben genannten Parameter isoliert zu untersuchen. Für die Regulation der Menge und Zusammensetzung des Trachealsekretes sind laut Mullol et al. (1992), Ramnarine et al. (1996) und Tobin et al. (2002) MR von Bedeutung, doch genaue Angaben über den Einfluss dieser Rezeptoren auf den ziliären Transport ohne zusätzliche Beeinflussung durch das Trachealsekret

fehlen. Frühere Veröffentlichungen beschreiben die Notwendigkeit der Interaktion zwischen Zilien und Mukus, damit es überhaupt zu einem effektiven Transport in der Trachea kommen kann (Sade et al. 1970; Wanner et al. 1996). Sleigh et al. (1988) schildern eine Reduktion des partikulären Transportes in der Trachea, nachdem der Mukus entfernt und durch Ringerlösung ersetzt worden war. Die ZSF blieb dabei unverändert. Im etablierten Messsystem wurde das Epithel vor Messbeginn sanft in Hepes-Ringer Puffer gewaschen und somit fast vollständig von bedeckendem Mukus befreit. Auch für die weiteren Messungen wurde die Trachea in Hepes-Ringer Puffer belassen, so dass sich während der Aufnahmen zur Messung der PTG keine kontinuierliche Sekretschicht aufbauen konnte. Trotzdem konnte über die gesamte Versuchsdauer ohne Probleme in den WT- und KO-Mäusen über die gesamte Länge der Trachea ein Partikeltransport beobachtet und die PTG gemessen werden. So zeigt diese Methode die Möglichkeit genau die gewünschten ziliären Parameter, ohne den zusätzlichen Einfluss durch das Trachealsekret zu messen. Zusätzlich bringt dieses Messsystem durch die Möglichkeit der stimulierenden und hemmenden Beeinflussung der PTG eine sehr gute Vergleichbarkeit der effektiven ziliären Leistung, denn wie an den Beispielen des M1 und M2 Rezeptorsubtypen bewiesen, können in diesem System trotz vergleichbarer ZSF hoch signifikante Unterschiede in der PTG aufgezeigt werden. Im Gegensatz zu früheren Partikeltransportmessungen (Burn 1954) kann in diesem System mit einer individuellen Geschwindigkeitsberechnung von ungefähr 300 Partikeln/Messpunkt (Messungen in WT-Mäusen) eine sehr große Datenmenge in die Ergebnisse mit einbezogen werden. Die Messungen des Transportes über die gesamte Länge der Trachea zeigt einen weiteren Vorteil dieser Methode, im Gegensatz zur Transportmessung unter Verwendung von Gewebeschnitten, wie beispielsweise von Kurosawa et al. (1995) durchgeführt. Durch die Verwendung des gesamten intakten Trachealepithels können mögliche funktionelle Defekte, wie eine herabgesetzte Koordination zwischen thorakal und weiter zervikal liegenden zilientragenden Zellen sichtbar gemacht werden. An Gewebeschnitten ist eine Herabsetzung der metachronalen Welle nicht messbar. Wie wichtig die zusätzliche Messung der Koordination ist, zeigt sich bei Defizienz des M1 Rezeptors. Bei Defizienz des M1 Rezeptors lässt sich eine herabgesetzte Koordination der zilientragenden Zellen vermuten. Viele bisherige

Untersuchungen fokussieren die Messungen der ZSF und lassen den wichtigen Parameter der Koordination zwischen den zilienträgenden Zellen unberücksichtigt (Lee et al. 2005).

Mit dieser Methode könnten durch fortführende Experimente die weiteren Möglichkeiten für eine Reduktion der PTG untersucht werden. So könnte beispielsweise durch den Einsatz von Medien mit unterschiedlicher Viskosität die Schlagkraft der einzelnen Zilien überprüft werden. Wäre die Schlagkraft durch Defizienz der MR verändert, könnten trotz unveränderter ZSF die Partikel nicht so schnell und effektiv transportiert werden. Diese Faktoren können mit diesem System sicher dargestellt werden.

Insgesamt zeigt die hier etablierte Methode zur Messung des partikulären Transportes eine sehr sichere, zuverlässige und äußerst vielseitige Einsatzmöglichkeit und lässt mit demselben Setup unter sehr ähnlichen Bedingungen die Messung der ZSF zu.

5.4 Einfluss der M1, M2 und M3 Rezeptorsubtypen auf PTG und ZSF im Trachealepithel

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass alle untersuchten muskarinischen Rezeptorsubtypen M1, M2 und M3 an der Regulation der genannten ziliären Funktionen im Trachealepithel beteiligt sind. Die Beteiligung an der Regulation der ZSF und PTG sind für jeden Rezeptorsubtyp unterschiedlich. Ihren Einfluss auf die PTG vermitteln alle drei Subtypen über verschiedene Mechanismen.

5.4.1 Der M3 Rezeptor

5.4.1.1 Einfluss auf die PTG

Die Defizienz des M3 Rezeptors resultierte in einer von Messbeginn an hoch signifikant reduzierten PTG und einem vollständigen Ausbleiben des Muskarin-induzierten Anstieges der PTG. Die ziliäre Transportleistung war herabgesetzt, was in den übermäßig vielen auf der Epitheloberfläche liegengebliebenen Partikeln sichtbar wurde. Miyata et al. (1989) und Wanner et al. (1996) beschreiben einen cholinergen Einfluss auf den mukoziliären Transport in der Trachea. In den dort beschriebenen pharmakologischen Studien konnte der mukoziliäre Transport durch die Zugabe von Atropin reduziert werden. Doch durch Zugabe von Atropin werden alle MR Subtypen antagonisiert. Daher gibt es keine Angaben, die dabei die einzelne Rolle der beteiligten MR Subtypen genauer

erklären. Die hier erbrachten Ergebnisse zeigen, dass der M3 Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Regulation des Partikeltransportes in der Trachea spielt. Der M3 Rezeptor hat einen stimulierenden Einfluss auf die PTG und ist wichtig für den Muskarin-induzierten Anstieg der PTG.

Über welchen Mechanismus stimuliert der M3 Rezeptor die PTG?

5.4.1.2 Einfluss auf die ZSF

Der fehlende Anstieg der PTG nach Muskarinzugabe und während der übrigen Messpunkte erfolgte aufgrund einer fehlenden Stimulation der ZSF in M3KO-Mäusen. Während der gesamten Messungen war die ZSF in den M3KO-Mäusen hoch signifikant reduziert und der Muskarin-induzierte Anstieg der ZSF fehlte völlig. Eine bedeutende Rolle des M3 Rezeptores bei der Regulation der ZSF wurde schon in früheren pharmakologischen Studien am Oesophagusepithel des Frosches oder an ovinen Trachealepithelzellen beschrieben (Salathe et al. 1997; Zagoory et al. 2001). Die hier erbrachten Ergebnisse zeigen eindeutig den großen Einfluss des M3 Rezeptors auf die ZSF und über diesen Mechanismus auf die PTG und seine Notwendigkeit für eine Muskarin-induzierte Steigerung der MC.

Für einen effektiven Partikeltransport in der Trachea ist eine ausreichend hohe ZSF nötig. Diese ist in M3KO-Tieren nicht gegeben, so dass zahlreiche Partikel nicht weiter transportiert werden und – wie in den aufgenommenen Filmen zu sehen - zum größten Teil auf dem Trachealepithel liegen bleiben.

5.4.1.3 Einfluss des M2 Rezeptors auf die durch den M3 Rezeptor vermittelten Effekte

Einen Einfluss eines Rezeptorsubtyps auf die Effekte eines anderen Rezeptorsubtyps in der Trachea ist bisher für die Bronchodilatation beschrieben worden. Die dabei beteiligten Subtypen wirken in ihrem Einfluss synergistisch. So ist laut Struckmann et al. (2003) ein vollständiges Ausbleiben der Muskarin-induzierten Bronchokonstriktion nur bei Defizienz sowohl des M2 als auch des M3 Rezeptors zu beobachten, nicht aber bei alleiniger Defizienz des M3 Rezeptors.

In unseren Messungen der PTG konnte die Stimulation des M2 Rezeptors die durch den M3 Rezeptor vermittelte Steigerung der PTG nach ATP-Zugabe hemmen.

Zusätzlich zu einer hoch signifikant herabgesetzten basalen PTG und dem Ausbleiben der Muskarin-induzierten Stimulation der PTG zeigte sich bei Defizienz des M3 Rezeptors eine signifikant reduzierte PTG nach ATP-Zugabe. Diese auch weiter bestehende Reduktion der PTG trotz Gabe eines MR unabhängigen Stimulus kann auf einen inhibitorischen Einfluss des M2 Rezeptorsubtyps zurückgeführt werden. Diese Schlussfolgerung basiert auf den folgenden drei Befunden:

Erstens, bei Defizienz des M2 Rezeptors induzierte die Zugabe von ATP und Muskarin einen gegenüber dem WT-Stamm signifikant gesteigerten Anstieg der PTG. Dies zeigte, dass der M2 Rezeptor einen hemmenden Einfluss auf die PTG besitzt.

Zweitens, bei vorheriger Blockierung aller MR durch Atropin konnte in M3KO-Mäusen nach Stimulation durch Muskarin der Anstieg der PTG nach ATP-Zugabe auf das Niveau des WT-Stammes gehoben werden. Durch Atropin wird auch der M2 Rezeptor geblockt und kann nicht mehr inhibitorisch auf die PTG einwirken. Nach Zugabe von ATP ist es deshalb möglich, die PTG auf das Niveau des WT-Stammes zu heben. Die zuverlässige Antagonisierung der MR durch Atropin zeigt sich im Ausbleiben der Muskarin-induzierten Steigerung der PTG im dazugehörigen WT-Stamm.

Drittens, bei Defizienz des M2 und des M3 Rezeptors steigerte sich die PTG signifikant nach Zugabe von Muskarin und erreichte nach Zugabe von ATP die vollständige Aktivität der PTG wie in WT-Mäusen. Dies steht im Gegensatz zur PTG Messung in M3KO-Tieren, die über den gesamten Versuchsverlauf eine hochsignifikant reduzierte PTG besitzen und das Niveau des WT-Stammes zu keinem Zeitpunkt der Messung erreichen.

5.4.1.4 Zusammenfassung

Der M3 Rezeptor steigert die ZSF und über diesen Mechanismus die PTG. Dabei ist er verantwortlich für den Muskarin-induzierten Anstieg. Die durch den M3 Rezeptor vermittelten Effekte unterliegen einem hemmenden Einfluss des M2 Rezeptors.

5.4.2 Der M2 Rezeptor

5.4.2.1 Einfluss auf die PTG

Die Ergebnisse der PTG bei Defizienz des M2 Rezeptors ergaben eine signifikante Steigerung der Geschwindigkeit nach Zugabe des MR-abhängigen Stimulus Muskarin und des MR-unabhängigen Stimulus ATP. Dies zeigte einen inhibitorischen Einfluss des M2 Rezeptors auf die PTG.

Doch über welchen Mechanismus wirkt der M2 Rezeptor inhibitorisch?

Die Untersuchungen der Morphologie (siehe Kapitel 5.1: „Einfluss der M1, M2 und M3 Rezeptorsubtypen auf die Morphologie des Trachealepithels) und die Messungen der ZSF (siehe Kapitel 5.4.2.2: „Der M2 Rezeptor: Einfluss auf die ZSF“) sind keine Ursachen für den inhibitorischen Einfluss der M2 Rezeptoren.

Aufgrund der Tatsache, dass mittels Real-time-Polymerasekettenreaktion weder M2 Rezeptor mRNA noch mittels Immunhistochemie M2 Rezeptor Protein im Trachealepithel gefunden werden konnte (Klein et al. 2008, eingereicht), erfolgt der hemmende Einfluss vermutlich über einen indirekten Weg. Unwahrscheinlich ist dagegen die Hemmung der PTG über eine Rezeptoraktivierung direkt auf den Epithelzellen. Eine Möglichkeit der indirekten Beeinflussung der PTG kann über autoinhibitorische M2 Rezeptoren auf Nervenfasern erfolgen. Diese M2 Rezeptoren verringern die Freisetzung von ACh, welches Kilbinger et al. (1991) pharmakologisch an Meerschweinchentracheen zeigen konnte. Laut Coulson und Fryer (2003) treten bei chronischen Atemwegserkrankungen dysfunktionale M2 Rezeptoren auf, woraufhin es zu einer pathologisch erhöhten Freisetzung von ACh kommt. Fehlte in unseren Versuchen der M2 Rezeptor, könnte es so zu einer vermehrten ACh-Freisetzung kommen, welche sich in einer gesteigerten Reaktion der PTG äußern könnte. Die Möglichkeit, durch ACh-Zugabe eine Steigerung der mukoziliären Transportrate zu erzeugen, zeigten Ballard et al. (2002) an der Schweinetrachea mit einer ACh-induzierten Steigerung um das dreifache der vorherigen mukoziliären Transportrate.

Bisher gibt es noch keinen Nachweis über vorhandene M2 Rezeptoren auf Nervenfasern in der Nähe des Trachealepithels bei Mäusen (Klein et al. 2008, eingereicht). Möglicherweise reicht aber der hemmende Einfluss der nachgewiesenen M2 Rezeptoren auf parasymphischen Nervenfasern (Yang und Biggs 1991; Matsumoto et al. 1995) für inhibitorische Auswirkungen aus.

Andererseits ist es möglich, dass die Expression neuronaler M2 Rezeptoren zu gering für die hier aufgebrachten Versuchsbedingungen war (Klein et al. 2008, eingereicht). Der immunhistochemische Nachweis der einzelnen MR-Subtypen gestaltet sich schwierig. Am Blasenepithel der Maus zeigten die unter Standardbedingungen verwendeten Antikörper gegen die einzelnen Subtypen hohe unspezifische Bindungskapazitäten (Zarghooni et al. 2007). Bisher konnten als einzige Zellen in direkter Nachbarschaft zum Epithel Perizyten als immunreaktive M2 Rezeptorzellen nachgewiesen werden (Klein et al. 2008, eingereicht). So könnte eine weitere Möglichkeit der indirekten Beeinflussung der PTG durch M2 Rezeptoren über eine Aktivierung der Rezeptoren auf den Perizyten stattfinden. Bisher gibt es aber noch keine Veröffentlichungen, die eine solche Interaktion zwischen Perizyten und Epithelzellen beschreiben. Möglicherweise wird die PTG von den nachgewiesenen M2 Rezeptoren auf den glatten Muskelzellen der Trachea (Struckmann et al. 2003) über dortige Freisetzung einer hemmend wirkenden Substanz beeinflusst. Aber auch zu einer solchen Interaktion zwischen Muskelzellen und Epithelzellen liegen zum heutigen Zeitpunkt keine Daten vor. Darüber hinaus wurden die Messungen der PTG stets am der dem Musculus trachealis gegenüber liegenden Seite durchgeführt. Für jede Messung wurde der Musculus trachealis der Länge nach aufgeschnitten und aufgeklappt, so dass er in keiner Messung direkt auf das über ihm liegende Epithel einwirken konnte. Abschließend kann der hemmende Mechanismus des M2 Rezeptors im Rahmen dieses Projektes nicht geklärt werden. Weiterführend sollte diese Fragestellung untersucht werden.

5.4.2.2 Einfluss auf die ZSF

Bei Defizienz des M2 Rezeptors unterschied sich die ZSF nach Muskarinzugabe in den KO-Tieren nicht vom korrespondierenden WT-Stamm. In den oberen Atemwegen des Menschen sehen auch Yang und McCaffrey (1996) keine Beteiligung des M2 Rezeptors an der Modulation der ZSF. Die hier vorgenommene Messung zeigte, dass die veränderte PTG im Vergleich zum WT-Stamm nicht wie bei M3 Rezeptordefizienz auf einer Veränderung der ZSF basierte. Darüber hinaus zeigten M2KO-Mäuse nach ATP-Zugabe eine signifikant erniedrigte ZSF im Vergleich zum WT-Stamm, die trotzdem in einer signifikant erhöhten PTG nach ATP-Zufuhr mündete.

Alles in allem ist es zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, den molekularen Mechanismus zu nennen, über den der M2 Rezeptor die PTG hemmend beeinflusst.

5.4.2.3 Einfluss der M2 Rezeptorwirkung auf M3 Rezeptor-vermittelte Effekte

Ein Einfluss der M2 Rezeptorwirkung auf Effekte des M3 Rezeptorsubtyps wurde bereits im Kapitel 5.4.1.3 „Einfluss des M2 Rezeptors auf die durch den M3 Rezeptor vermittelten Effekte“ diskutiert.

5.4.2.4 Zusammenfassung

Der M2 Rezeptor hat einen hemmenden Einfluss auf die PTG ohne Beeinflussung der ZSF. Dabei wirkt er über einen indirekten Mechanismus, da er im Epithel nicht nachgewiesen werden konnte. Er besitzt einen hemmenden Einfluss auf die durch den M3 Rezeptor-vermittelte Steigerung der MC.

5.4.3 PTG in M2M3-Doppel-KO-Mäusen

Die zusätzliche Messung der PTG in M2M3-Doppel-KO-Mäusen wurde durchgeführt, um den hemmenden Einfluss des M2 Rezeptors auf den M3 Rezeptor zu verifizieren. In diesen Tieren fehlte nicht nur der M3 Rezeptor, sondern darüber hinaus auch der M2 Rezeptor, so dass ein M2 Rezeptor-bedingter hemmender Einfluss auszuschließen ist. Im Gegensatz zur PTG in M3KO-Tieren konnte die PTG nach Muskarinzugabe signifikant gesteigert und nach ATP-Zugabe sogar auf das Niveau des WT-Stammes gehoben werden. Diese Ergebnisse zeigen den hemmenden Einfluss des M2 auf die M3 Rezeptor-vermittelte Steigerung der mukoziliären Clearance und wurden bereits in Kapitel 5.4.1.3 „Einfluss des M2 Rezeptors auf die durch den M3 Rezeptor vermittelten Effekte“ diskutiert.

5.4.4 Der M1 Rezeptor

5.4.4.1 Einfluss auf die PTG

M1KO-Mäuse zeigten während der gesamten Versuchsdauer eine hoch signifikant reduzierte PTG im Vergleich zu den WT-Mäusen. Die Zugabe von Muskarin und ATP konnte die PTG zwar signifikant steigern, sie erreichte jedoch zu keinem Zeitpunkt die Geschwindigkeit wie in den WT-Tieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch der M1 Rezeptor eine bedeutende Rolle in der Regulation der PTG spielt. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die Daten der Messungen der

PTG in M2M3KO-Tieren. Diese Doppel-KO-Tiere, mit ihren vorhandenen M1 Rezeptoren, reagierten in ihrer PTG mit einem signifikanten Anstieg nach Muskarinzugabe, erreichten aber auch hier nicht das Niveau des WT.

Obwohl die PTG in den M1KO-Mäusen ähnlich wie in den M3KO-Tieren hoch signifikant reduziert war, ist der Mechanismus für die Reduzierung verschieden im Vergleich zu den M3KO-Tieren. Yang und McCaffrey (1996) beschreiben eine Beteiligung des M1 Rezeptors an der Regulation der ZSF in den oberen Atemwegen des Menschen, was sich in den hier vorliegenden Versuchen für das Trachealepithel der Maus nicht zeigte (siehe Kapitel 5.4.4.2 „Einfluss auf die ZSF“).

In M1KO-Tieren wurde bei den morphologischen Untersuchungen eine signifikant erhöhte Anzahl an neuroendokrinen Zellen im zervikalen Trachealabschnitt gefunden. Da die Reduktion der PTG jedoch über die gesamte Länge bis zur Bifurkation der Trachea gemessen werden konnte, ist die erhöhte Anzahl der neuroendokrinen Zellen ausschließlich im zervikalen Teil der Trachea nicht die Ursache für die Reduktion der PTG in M1KO-Tieren. Aufgrund der Tatsache, dass bei allen Versuchen das Trachealsekret entfernt und somit keine Rolle spielte, konnten Veränderungen in der Menge oder in der Zusammensetzung des Sekretes hervorgerufen durch Defizienz des M1 Rezeptors nicht die Ursache für die veränderte PTG sein.

Wenn eine Beeinflussung durch die ZSF, die Morphologie und das Trachealsekret nicht für die Reduktion der PTG verantwortlich sind, über welchen Mechanismus kommt die Reduktion der PTG zustande?

Zur Klärung dieser Frage wurde zuerst ein möglicher Einfluss anderer MR-Subtypen auf den M1 Rezeptor untersucht. Möglicherweise wirkt der M2 Rezeptor wie in M3KO-Tieren inhibitorisch auch auf den M1 Rezeptor und reduziert dadurch die PTG.

Die vorherige Zugabe von Atropin und die damit verbundene Blockierung aller MR-Subtypen konnte in M1KO-Tieren – im Gegensatz zu den Messungen in M3KO-Tieren - den ATP-induzierten Anstieg der PTG nicht auf das Niveau des WT heben. Somit ist ein hemmender Einfluss des M2 Rezeptors nicht für die Reduktion der PTG bei Defizienz des M1 Rezeptors verantwortlich.

Yang und Biggs (1991) sehen eine Beeinflussung der cholinergen Neurotransmission durch Modulation des in parasympathischen Ganglien erregend wirkenden M1 Rezeptors. So wäre bei Defizienz dieser erregenden M1 Rezeptoren eine Reduktion der PTG durch einen verringerten cholinergen Grundtonus möglich. Dagegen spricht aber die Tatsache, dass auch nach exogener pharmakologischer Stimulation der MR und einer damit verbundenen Steigerung des cholinergen Tonus die PTG zu keinem Zeitpunkt auf das Niveau des WT-Stammes gehoben werden konnte. So ist dieser Mechanismus als Ursache für die verringerte PTG nicht wahrscheinlich. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass der M1 Rezeptor keinen Einfluss auf die ZSF hat und dass bei seiner Abwesenheit die PTG reduziert ist.

Für einen effektiven Transport ist neben der ZSF auch die Koordination zwischen den einzelnen Zilien von großer Bedeutung (Wanner et al. 1996). Mit den Messungen des gerichteten Partikeltransportes in der Trachea wurde der Fokus auf den Parameter der Koordination zwischen den zilientragenden Zellen gelegt. Wäre diese herabgesetzt, so wäre sie für die Reduktion der PTG trotz unveränderter ZSF verantwortlich. Tatsächlich fanden sich in M1KO-Tieren, im Vergleich zu den anderen KO-Stämmen und den korrespondierenden WT-Mäusen, eine erhöhte Anzahl von Epithelstellen, über denen kein gerichteter Transport stattfand (siehe Kapitel 5.4.4.4: „Einfluss des M1 Rezeptors auf die Koordination zwischen zilientragenden Zellen im Trachealepithel“). Ob sie aber tatsächlich der Grund für die Reduktion der PTG war, konnte im Rahmen der hier durchgeführten Experimente nicht vollständig bewiesen werden.

5.4.4.2 Einfluss auf die ZSF

Die Messungen der ZSF bei Defizienz des M1 Rezeptors zeigten vor und nach Zugabe von Muskarin keinen Unterschied zur ZSF im korrespondierenden WT-Stamm, obwohl eine Reduzierung der PTG erfolgte. Dadurch kann die Reduktion der PTG nicht durch eine Beeinflussung der ZSF erklärt werden. Zusammenfassend kann für den M1 Rezeptor gezeigt werden, dass bei seiner Abwesenheit die PTG reduziert ist, ohne Beeinflussung der ZSF.

5.4.4.3 Einfluss verschiedener MR Subtypen auf Effekte des M1 Rezeptors

Einen Einfluss auf die M1 Rezeptor-vermittelten Effekte durch die verschiedenen MR Subtypen konnte im Rahmen der durchgeführten Experimente nicht

nachgewiesen werden. Die vorherige Zugabe von Atropin und die damit verbundene Blockierung aller MR-Subtypen konnte in M1KO-Tieren – im Gegensatz zu den Messungen in M3KO-Tieren - den ATP-induzierten Anstieg der PTG nicht auf das Niveau des WT-Stammes heben. Trotz Blockierung des M2 Rezeptors bleibt die PTG nach ATP Zugabe über die gesamte Messdauer im Vergleich zum korrespondierenden WT-Stamm hoch signifikant reduziert. Somit ist eine Wechselwirkung zwischen dem M1 und dem M2 Rezeptorsubtyp bzw. ein hemmender Einfluss des M2 Rezeptors auf die Effekte des M1 Rezeptors nicht für die Reduktion der PTG bei Defizienz des M1 Rezeptors verantwortlich. Über einen direkten Einfluss der M1 Rezeptor-vermittelten Wirkung auf die Effekte des M3 Rezeptors kann bei den hier durchgeführten Versuchen keine Aussage getroffen werden.

5.4.4.4 Einfluss des M1 Rezeptors auf die Koordination zwischen zilientragenden Zellen im Trachealepithel

Ein weiterer wichtiger Parameter für den Ablauf eines ungestörten Partikeltransportes ist die Koordination zwischen den zilientragenden Zellen. Durch ein Zusammenspiel dieser Zellen entsteht eine metachronale Welle und diese transportiert durch gerichteten Transport Schleim und Partikel in Richtung Kehlkopf (Wong et al. 1993). Es sind noch nicht alle Faktoren für eine ungestörte Koordination vollständig geklärt (Wanner et al. 1996), ebenso wie die Beteiligung der MR an der Koordination der zilientragenden Zellen in der Trachea (Sleigh 1988; Wanner et al. 1996). Möglicherweise ist die reduzierte PTG auf eine verminderte Koordination innerhalb einer zilientragenden Zelle oder zwischen verschiedenen zilientragenden Zellen zurück zu führen. So könnten die Partikel trotz unveränderter ZSF nicht die PTG wie im korrespondierenden WT-Stamm erreichen. Durch Aufnahmen des Partikeltransportes über die gesamte Länge der Trachea wurde in den hier durchgeführten Experimenten nach Hinweisen auf eine herabgesetzte Koordination gesucht. Tatsächlich konnte in den M1KO-Tieren Stellen des Trachealepithels gefunden werden, über denen ein gerichteter Transport nicht stattfand. Die zilientragenden Zellen schlugen die Partikel nicht in Richtung Kehlkopf sondern kreisförmig, so dass mit zunehmender Partikelzahl große Verwirbelungen der Partikel beobachtet werden konnten. Neben diesen Verwirbelungen konnten aber immer große Bereiche beobachtet werden, in denen

ein ungestörter Partikeltransport stattfand. Zudem fanden sich diese Verwirbelungen nicht nur in M1KO-Tieren, sie konnten – wenn auch in geringerem Ausmaß - in M3KO-Tieren und im korrespondierenden WT-Stamm nachgewiesen werden. Eine Untersuchung der Koordination innerhalb einer zilientragenden Zelle wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

So gibt es bisher noch keine direkten Daten, die den Mechanismus erklären können, über den eine signifikante Reduzierung der PTG in M1KO-Tieren ausgelöst wird. Interessant für weitere Projekte bleibt der Fokus auf einer genaueren Messung der Koordination zwischen den zilientragenden Zellen. Weiterhin ist die Etablierung einer Methode zur Messung der Kraft eines Zilienschlages von Interesse, da bei einer Reduzierung der Kraft die PTG reduziert, die ZSF aber unverändert sein kann.

5.4.4.5 Zusammenfassung

Der M1 Rezeptor hat keinen Einfluss auf die ZSF, bei Defizienz ist die PTG reduziert, wobei der Mechanismus nicht bekannt ist. Vermutlich ist die Koordination zwischen den zilientragenden Zellen herabgesetzt. Eine Wechselwirkung mit anderen MR Subtypen konnte im Rahmen der untersuchten Parameter nicht nachgewiesen werden.

5.5 MR: Target bei chronischen Atemwegserkrankungen

Chronisch obstruktive Atemwegserkrankungen (COPD) sind mit steigender Prävalenz eine der häufigsten Erkrankungs- und Todesursachen in der Welt (Barnes 2003). Bisher sind die laufenden Therapien nicht sehr effektiv und keine Behandlung vermag die progressive Einschränkung der Atmung zu verhindern (Barnes 2003).

Die Hauptstütze in der Behandlung ist der Einsatz von Anticholinergika, kombiniert mit β_2 -Agonisten (Barnes 2003).

Bei chronischen Atemwegserkrankungen wie COPD und Asthma werden Antagonisten der MR eingesetzt, um eine Bronchodilatation zu erreichen (Joos et al. 2003), die Hypersekretion zu reduzieren (Tamaoki et al. 1994) und den pathologisch gesteigerten cholinergen Grundtonus in den Atemwegen zu verringern (Coulson und Fryer, 2003). Eine Reduzierung des cholinergen Grundtonus ist häufig die einzige reversible Komponente bei chronischen

Atemwegserkrankungen (Barnes 2004b). Ein krankhaft erhöhter cholinerg Grundtonus kommt vor allem aufgrund dysfunktionaler autoinhibitorischer M2 Rezeptoren (Belmonte 2005) zustande, die nicht mehr reduzierend auf die ACh-Freisetzung wirken können. Durch die vermehrte ACh-Ausschüttung werden die M2 und M3 Rezeptorsubtypen auf den glatten Muskelzellen verstärkt aktiviert, was in einer gesteigerten Bronchokonstriktion resultiert. Die gesteigerte Bronchokonstriktion vermindert bei den Patienten deutlich die Lebensqualität und führt zur Exacerbation des Krankheitsbildes (Disse 2001).

Neben der Verringerung der Bronchokonstriktion versucht man während der Behandlung der Atemwegserkrankungen die MC nicht negativ zu beeinflussen. Eine verminderte MC bedeutet eine Herabsetzung des primären Schutz- und Verteidigungsmechanismus der Atemwege gegen eingeatmete Mikroorganismen und schädliche Partikel. Diese Herabsetzung der natürlichen Barriere begünstigt das Entstehen zusätzlicher Atemwegsinfektionen. So ist laut Rogers (2005) u.a. der reduzierte mukoziliäre Transport eine sehr wichtige Komponente in der Pathologie der chronischen Atemwegserkrankungen. Um möglichst genau die spezifische Rolle der einzelnen MR bei der ziliären Funktion zu untersuchen, wurden die PTG und die ZSF untersucht.

Bei den hier durchgeführten Tests zur Erforschung der spezifischen Rolle der einzelnen MR Subtypen wurde das Tiermodell Maus verwendet. Bisher ist es nur möglich ein KO-Modell von Mäusen herzustellen. Sowohl die Maus als auch der Mensch besitzen in den Atemwegen alle Komponenten des neuronalen und non-neuronalen cholinergen Systems und den Mechanismus der MC, so dass im gewissen Rahmen sicher vergleichbare Rückschlüsse auf die Einsatzmöglichkeiten beim Menschen zugelassen werden können.

Im Gegensatz zu den M1KO- und den M3KO-Tieren zeigten M2M3Doppel-KO-Mäuse keine Unterschiede in der PTG im Vergleich zum WT-Stamm und reagieren noch mit einer signifikanten PTG-Zunahme nach Zugabe von Muskarin. Auch kann die PTG, wie hier durch die Zugabe von ATP gezeigt, signifikant gesteigert und auf das Niveau des WT-Stammes gehoben werden. Durch die nahezu unveränderte PTG und den vergleichbaren ziliären Transport wie im WT-Stamm zeigten sich gute Bedingungen für eine unveränderte MC. So ergibt sich aus den gesamten Ergebnissen als günstiges Rezeptortarget zur Behandlung

chronischer Atemwegserkrankungen die kombinierte Antagonisierung der M2 und M3 Rezeptorsubtypen, jedoch ohne Interferenz mit dem M1 Rezeptorsubtyp. Auf der einen Seite ist durch die Blockierung der M2 und M3 Rezeptorsubtypen eine optimale Bronchodilatation (Struckmann et al. 2003) gewährleistet, während auf der anderen Seite die PTG nur minimal herabgesetzt ist. Einige Autoren halten eine Antagonisierung der M1 und M3 Rezeptorsubtypen für therapeutisch sinnvoll (MacLagan und Barnes, 1989; Lee et al. 2001). Die hier erbrachten Ergebnisse zeigten aber die große Bedeutung, den M1 Rezeptor nicht zu blockieren. Bei Blockierung des M1 Rezeptores ist eine Reduzierung der PTG wahrscheinlich nicht zu vermeiden. Obwohl keine Unterschiede in der ZSF im Vergleich zum WT-Stamm vor und nach Muskarinzugabe zu finden sind, ist der effektive Transport hoch signifikant herabgesetzt und lässt sich auch nicht durch die verschiedenen eingesetzten Stimuli steigern. Wird dann in Kombination zusätzlich zum M1 auch noch der M3 Rezeptor antagonisiert, ist eine erhebliche Verschlechterung des mukoziliären Transportes zu erwarten. Durch den bisherigen Einsatz unselektiver Anticholinergika, wie z.B. Atropin, ist der mukoziliäre Transport herabgesetzt (Lurie et al. 1985; Miyata et al. 1989). Der Einsatz selektiver Therapeutika ist jedoch schwierig, da die Entwicklung selektiver Anticholinergika aus pharmakologischer Sicht bisher nicht vollständig gelungen ist.

Laut Barnes (2004a) ist der klinische Einsatz eines selektiven M3 Antagonisten bei den oben erwähnten chronischen Atemwegserkrankungen sinnvoll, um nicht durch eine zusätzliche Antagonisierung des M2 Rezeptorsubtyps eine noch funktionierende autoinhibitorische M2 Rezeptorfunktion zu beeinträchtigen. Doch eine Blockung des M3 Rezeptors wirkt sich negativ auf die ZSF aus, die laut Boek (2002) ein sehr wichtiger Parameter für eine gut funktionierende MC ist. So ist, bei alleiniger Antagonisierung des M3 Rezeptorsubtyps eine Herabsetzung der MC zu erwarten. Darüber hinaus kann, wie Struckmann et al. (2003) darstellten, die Bronchokonstriktion durch alleinige M3 Blockierung nur unvollständig antagonisiert werden. Trotz dieser Bedenken ist die zurzeit erfolgreichste Therapie chronischer Atemwegserkrankungen eine Antagonisierung des M3 Rezeptors. Ein M3 Antagonist mit einer relativ hohen Selektivität ist Tiotropiumbromid (Barnes 2003). Er zeigt eine deutlichere Verbesserung der

Krankheitssymptome als das seit den 70iger Jahren verwendete Ipratropiumbromid (Joos et al. 2003).

Für den klinischen Ausblick zeigen die hier am Tiermodell Maus erhobenen Ergebnisse im Zusammenhang mit den bisher veröffentlichten Daten zur Behandlung chronischer Atemwegserkrankungen einen sinnvollen Therapieansatzpunkt in der Antagonisierung der M2 und M3 Rezeptorsubtypen, ohne Beeinflussung des M1 Rezeptors.

6 Zusammenfassung

Neuronales und non-neuronales Azetylcholin (ACh) vermittelt seine Wirkung über muskarinische Rezeptoren (MR). Es gibt bei Tier und Mensch 5 verschiedene MR Subtypen, M1-M5, die alle zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren gehören. Die Kopplung der MR an ihre bevorzugten G-Proteine löst die weitere Signalkaskade aus und moduliert zahlreiche zelluläre Prozesse. Der Interaktion zwischen ACh und den MR im non-neuronalen cholinergen System wird eine tragende Rolle bei der Zellproliferation, Differenzierung, Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und der ziliären Funktion zugewiesen. Dies erklärt die große klinische Bedeutung u.a. bei der Behandlung chronischer Atemwegserkrankungen. Während die spezifische Wirkung der MR vor allem an Neuronen, Herzmuskelzellen, Drüsenzellen und glatten Muskelzellen bekannt und ausführlich beschrieben ist, ist die spezifische Bedeutung der verschiedenen im respiratorischen Epithel vorkommenden MR noch weitgehend unbekannt. Das Ziel der Arbeit war das Erforschen der spezifischen Rolle der im Trachealepithel vorkommenden dominanten MR Subtypen M1, M2 und M3. Wegen der mangelnden Selektivität der vorhandenen Agonisten und Antagonisten konnten die bisher veröffentlichten pharmakologischen Untersuchungen die spezifische Rolle der einzelnen Subtypen nicht klären.

In dieser Arbeit dienten als Versuchsmodell MR KO-Mäuse, die jeweils defizient für einen Rezeptorsubtyp sind. Bei diesen Tieren ist das jeweilige Gen zur Rezeptorbildung lebenslang ausgeschaltet, so dass gezielt auf die Wirkung der einzelnen Subtypen geschlossen werden kann. Die Tracheen der KO-Mäuse wurden morphologisch und funktionell im Vergleich zu ihrem korrespondierenden Wildtyp (WT)-Stamm untersucht. Veränderungen der Morphologie des Trachealepithels wurden auf immunhistochemischer, licht- und elektronenmikroskopischer Ebene bestimmt und die relative Anzahl der Zelltypen des Trachealepithels gezählt. Zur Austestung der Zilienfunktion wurde die mukosale Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) in einer eigens dafür etablierten Methode gemessen und, mit demselben Versuchsaufbau, die Zilienschlagfrequenz (ZSF) nach Stimulation mit Muskarin (M) und ATP ermittelt. Mit dieser neu etablierten Messmethode ist es möglich, die PTG in der Trachea unabhängig von

der Mukusproduktion zu bestimmen. Ohne Beeinflussung der Mukusproduktion kann so direkt auf den Einfluss der verschiedenen MR auf die effektive Transportleistung der zilientragenden Zellen geschlossen werden.

Es ergaben sich keine Unterschiede in der Anzahl und Morphologie der zilientragenden, nicht-zilientragenden und der Basalzellen bei M1KO-, M2KO- und M3KO-Mäusen im Vergleich zu ihrem korrespondierenden WT-Stamm. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich ein differenziertes zilientragendes Epithel auch in Abwesenheit der Rezeptorsubtypen M1, M2 und M3 entwickelt. Bei der Messung der PTG in den unterschiedlichen KO-Stämmen konnte gezeigt werden, dass alle 3 untersuchten Rezeptorsubtypen fundamental an der Regulation des Partikeltransportes beteiligt sind. Der M3 Subtyp stimuliert die PTG, während der M2 Rezeptor einen hemmenden Einfluss auf die PTG besitzt. Bei Defizienz des M1 Rezeptors ist die PTG hoch signifikant erniedrigt. Alle 3 Subtypen agieren in ihrer Einflussnahme auf die PTG über unterschiedliche Mechanismen. Der M3 Rezeptor steigert die ZSF und dadurch die PTG, während der M1 und M2 Rezeptor nicht die ZSF beeinflussen. Der Mechanismus, über den es in M1KO-Tieren zu einer Reduktion der PTG und in M2KO-Tieren zu einer gesteigerten PTG kommt, konnte in dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Ein Fehlen des M1 Rezeptors verringert möglicherweise die Koordination zwischen den zilientragenden Zellen und könnte über diesen Weg zu einer verminderten PTG führen.

Im Gegensatz zu den M1KO- und den M3KO-Tieren zeigen M2M3Doppel-KO-Mäuse keine Unterschiede in der PTG nach Zugabe von ATP im Vergleich zum WT-Stamm. Zusätzlich reagieren sie noch mit einer signifikanten PTG-Steigerung auf die Zugabe von Muskarin. So ist auf der einen Seite durch die Blockierung der M2 und M3 Rezeptorsubtypen eine Bronchodilatation gewährleistet, während auf der anderen Seite die PTG nur minimal herabgesetzt ist, was wichtig für die Aufrechterhaltung der mukoziliären Clearance ist.

Im Hinblick auf ein optimales Rezeptortarget zur Behandlung chronischer Atemwegserkrankungen scheint die selektive Antagonisierung der M2 und M3 Rezeptorsubtypen ohne Interferenz mit dem M1 Rezeptorsubtyp sinnvoll.

7 Summary

Both neuronal and non-neuronal acetylcholine (ACh) act via muscarinic receptors (MR). Five different mammalian MR subtypes are known (M1 – M5) which all belong to the family of G-protein coupled receptors. Coupling of MR to G-proteins initiates a signal cascade and modulates several cellular processes. Non-neuronal cholinergic signalling via MR is assumed to play an important role in the regulation of cellular proliferation, differentiation, maintenance of cell-cell-contacts and ciliary function. This explains its clinical significance, e. g. in the treatment of chronic airway diseases. While the function of MR in neurons, cardiomyocytes, glandular cells and smooth muscle cells is largely known, a detailed analysis of the different MR in the respiratory epithelium is largely missing. The present study was aimed to determine the specific role of the MR subtypes M1, M2 and M3 in the tracheal epithelium. Since presently available agonists and antagonists are not fully subtype-specific previous pharmacological studies have not been able to clarify this subject.

This study was conducted on knockout mice (KO mice) that are genetically deficient for either of these receptor subtypes. Tracheas of these mice and corresponding wild-type (WT) mice were investigated morphologically and functionally. Epithelial morphology was investigated by immunohistochemistry, light- and electronmicroscopy, and the relative frequency of the different cell types was determined. Ciliary function was evaluated by measuring particle transport speed (PTS) and ciliary beat frequency (CBF) in a newly established experimental set up. The effect of stimulation with either muscarine (M) or ATP was evaluated. This experimental approach allows to measure PTS in the trachea independent from mucus production. Thus, it allows to evaluate directly the influence of different MR subtypes on the effective transport capacity generated by the ciliated cells.

There were neither differences in the number nor in morphology of the ciliated, non-ciliated and basal cells in M1KO, M2KO and M3KO mice compared to their corresponding WT strains. These data show that a differentiated ciliated epithelium develops in absence of receptor subtypes M1, M2 and M3. PTS measurements revealed that all three receptor subtypes are critically involved in

regulation of particle transport. The M3 subtype stimulates PTS while the M2 subtype exerts an inhibitory influence. Deficiency of the M1 receptor leads to a highly significant reduction in PTS. All three subtypes act via different mechanisms. The M3 receptor stimulates CBF and thereby PTS while the M1 and M2 receptor have no influence on CBF. The mechanism that is responsible for the reduction of PTS in M1KO mice or an acceleration in M2KO mice could not be entirely elucidated in this study. Possibly, deficiency in the M1 receptor leads to reduced coordination of ciliary beat, thereby resulting in a reduced PTS.

In contrast to M1KO and M3KO mice, M2M3double KO mice responded to stimulation with ATP comparable to the WT-strain. Moreover, muscarine lead in these mice to a significant PTS increase. Translated to the situation and pharmacological treatment in human disease this would mean that combined inhibition of the M2 and M3 receptor will result in bronchodilatation while PTS is minimally reduced which is important for maintenance of mucociliary clearance. Thus, a selective combined inhibition of M2 and M3 receptor subtypes without interference with the M1 receptor subtype appears to be advantageous in the treatment of chronic airway diseases.

8 Literaturverzeichnis

Arredondo J, Nguyen VT, Chernyavsky AI, Bercovich D, Orr-Urtreger A, Kummer W, Lips K, Vetter DE, Grando SE (2002) Central role of $\alpha 7$ nicotinic receptor in differentiation of the stratified squamous epithelium. *J Cell Biol* 159:325-336

Ballard ST, Trout L, Mehta A, Inglis SK (2002) Liquid secretion inhibitors reduce mucociliary transport in glandular airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:329-335

Barnes PJ (1993) Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Sci* 52:521-527

Barnes PJ (2003) Therapy of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Therap* 97:87-94

Barnes PJ (2004a) Distribution of receptor targets in the lung. *Proc Am Thorac Soc* 1:345-351

Barnes PJ (2004b) The role of anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med* 117:24-32

Basbaum CB, Grillo MA, Widdicombe JH (1984) Muscarinic receptors: evidence for a nonuniform distribution in tracheal smooth muscle and exocrine glands. *J Neurosci* 4:508-520

Baur R (1969) Zur Schätzung des kleinsten zulässigen Stichprobenumfangs für stereologische Messungen an histologischen Schnitten. *Experientia* 25:554-555

Belmonte KE (2005) Cholinergic pathways in the lungs and anticholinergic therapy for chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2:297-304; discussion 311-312

Boek WM, Graamans K, Natzijs H, van Rijk PP, Huizing EH (2002) Nasal mucociliary transport: new evidence for a key role of ciliary beat frequency. *Laryngoscope* 112:570-573

Burn JH (1954) Acetylcholine as a local hormone for ciliary movement and the heart. *Pharmacol Rev* 6:107-112

Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC, Wess J (2003) Use of M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Neurochem Res* 28:437-442

Caulfield MP (1993) Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmac Ther* 58:319-379

Caulfield MP, Birdsall NJM (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50:279-290

Centanni S, Camporesi G, Tarsia P, Guarnieri R, Allegra L (1998) Effect of atropine on ciliary beat in human upper respiratory tract epithelial cells. *Int J Tissue React* 20:131-136

Connolly TP, Noujaim AA, Man SF (1978) Simultaneous canine tracheal transport of different particles. *Am Rev Respir Dis* 118:965-968

Coulson FR, Fryer AD (2003) Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol Ther* 98:59-69

Delmotte P, Sanderson MJ (2006) Ciliary beat frequency is maintained at a maximal rate in the small airways of mouse lung slices. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:110-117

Disse B (2001) Antimuscarinic treatment for lung diseases from research to clinical practice. *Life Sci* 68:2557-2564

Drenckhahn D (2003) Kapitel: Zellenlehre, in: Anatomie, Urban & Fischer, München, Jena, Band 1: 9-91

Eglen RM (2006) Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton Autacoid Pharmacol* 26:219-233

Ericson LE, Håkanson R, Larson B, Owman Ch, Sundler F (1972) Fluorescence and electron microscopy of amine-storing enterochromaffin-like cells in tracheal epithelium of mouse. *Z Zellforsch* 124:532-545

Fichtl B, Fülgraff G, Neumann HG, Wollenberg P, Forth W, Henschler D, Rummel W (1996) Kapitel: Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Spektrum, Heidelberg, S.12-16

Foster WM, Walters DM, Longphre M, Macri K, Miller LM (2001) Methodology for the measurement of mucociliary function in the mouse by scintigraphy. *J Appl Physiol* 90:1111-1117

Fryer AD, el-Fakahany EE (1990) Identification of three muscarinic receptor subtypes in rat lung using binding studies with selective antagonists. *Life Sci* 47:611-618

Fujii T, Tsuchiya T, Yamada S, Fujimoto K, Suzuki T, Kasahara T, Kawashima K (1996) Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines. *J Neurosci Res* 44:66-72

Fujii T, Yamada S, Watanabe Y, Misawa H, Tajima S, Fujimoto K, Kasahara T, Kawashima K (1998) Induction of choline acetyltransferase mRNA in human mononuclear leukocytes stimulated by phytohemagglutinin, a T-cell activator. *J Neuroimmunol* 82:101-107

- Gabridge MG, Coe Agee C, Cameron AM (1977) Differential distribution of ciliated epithelial cells in the trachea of hamsters: Implications for studies of pathogenesis. *J Inf Dis* 135:9-19
- Garssen J (1993) Functional characterization of muscarinic receptors in murine airways. *Br J Pharmacol* 109:53-60
- Gheber L, Priel Z (1989) Synchronization between beating cilia. *Biophys J* 55:183-191
- Grando SA, Kawashima K, Wessler I (2003) Introduction: The non-neuronal cholinergic system in humans. *Life Sci* 72 2009-2012
- Hamm HE (1998) The many faces of G-protein signaling. *J Biol Chem* 273:669-672
- Hayashi T, Kawakami M, Sasaki S, Katsumata T, Mori H, Yoshida H, Nakahari T (2005) ATP regulation of ciliary beat frequency in rat tracheal and distal airway epithelium. *Exp Physiol* 95:535-544
- Hansell MM, Moretti RL (1969) Ultrastructure of the mouse tracheal epithelium. *J Morph* 128:159-170
- Hingley ST, Hastie AT, Kueppers F, Higgins ML, Weinbaum G, Shryock T (1986) Effect of ciliostatic factors from *Pseudomonas aeruginosa* on rabbit respiratory cilia. *Infect Immun* 51:254-262
- Jacoby DB, Fryer AD (2001) Anticholinergic therapy for airway diseases. *Life Sci* 68:2565-2572
- James A, Ryan G (1997) Testing airway responsiveness using inhaled methacholine or histamine. *Respirology* 2:97-105

Jeffery PK, Reid L (1975) New observations of rat airway epithelium: a quantitative and electron microscopic study. *J Anat* 120:295-320

Joos GF, Brusselle G, Derom E, Pauweis R (2003) Tiotropium bromide: a long-acting anticholinergic bronchodilator for the treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Clin Pract* 57:906-909

Kawashima K, Fujii T (2000) Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther* 86:29-48

Kerem E, Bistrizter T, Hanukoglu A, Hofmann T, Zhou Z, Bennett W, MacLaughlin E, Barker P, Nash M, Quittell L, Boucher R, Knowles MR (1999) Pulmonary epithelial sodium-channel dysfunction and excess airway liquid in pseudohypoaldosteronism. *N Engl J Med* 341:156-162

Kilbinger H, Schneider R, Siefken H, Wolf D, D'Agostino G (1991) Characterization of prejunctional muscarinic autoreceptors in the guinea-pig trachea. *Br J Pharmacol* 103:1757-1763

Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Münch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Höhle KD, Schemann M, Racke K, Wessler I (1997) Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedbergs Arch Pharmacol* 335:515-523

Klapproth H, Racke K, Wessler I (1998) Acetylcholine and nicotine stimulate the release of granulocyte-macrophage colony stimulating factor from cultured human bronchial epithelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357:472-475

Klein MK, Haberberger RV, Hartmann P, Lips KS, Krain B, Wess J, Kummer W, König P (eingereicht 2008) Muscarinic receptor subtypes in cilia-driven transport and airway epithelial development.

Knowles MR (2006) Gene modifiers of lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 12:416-424

Knowles MR, Boucher RC (2002) Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 109:571-577

Kummer W, Wiegand S, Akinci S, Wessler I, Schinkel AH, Wess J, Koepsell H, Haberberger RV, Lips KS (2006) Role of acetylcholine and polyspecific cation transporters in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse. *Respir Res* 7:65

Kurosawa H, Wang CG, Dandurand RJ, King M, Eidelman DH (1995) Mucociliary function in the mouse measured in explanted lung tissue. *J Appl Physiol* 79:41-46

Lee AM, Jacoby DB, Fryer AD (2001) Selective muscarinic receptor antagonists for airway diseases. *Curr Opin Pharmacol* 1:223-229

Lee CH, Lee SS, Mo JH, Kim IS, Quan SH, Wang SY, Yi WJ, Rhee CS, Min YG (2005) Comparison of ciliary wave disorders measured by image analysis and electron microscopy. *Acta Otolaryngol* 125:571-576

Lee RMKW, Forrest JB (1997) Chapter: Structure and function of cilia, in: *The Lung*, Raven, Philadelphia, 1:459-478

Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, Ermert L, Kummer W, Koepsell H (2005) Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:79-88

Loewi O (1921) Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch* 189:239-242

Lurie A, Pascal O, Castillon du Perron M, Grandordy B, Huchon G, Chretien J (1985) Pharmacology of mucociliary transport. *Rev Mal Respir* 2:117-126

MacLagan J, Barnes PJ (1989) Muscarinic pharmacology of the airways. *Trends Pharmacol Sci Suppl*:88-92

Mariassy AT (1992) Chapter: Epithelial cells of trachea and bronchi, in: *Comparative biology of the normal lung*, Vol:1, CRC Press, Boca Raton, S. 63-76

Matsumoto S, Nagayama T, Kanno T, Yamasaki M, Shimizu T (1995) Evidence for the presence of function of the inhibitory M2 receptors in the rabbit airways and lungs. *J Auton Nerv Syst* 53:126-136

Matthiesen S, Bahulayan A, Kempkens S, Haag S, Fuhrmann M, Stichnote C, Juergens UR, Racke K (2006) Muscarinic receptors mediate stimulation of human lung fibroblast proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:621-627

Metzen J, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Kilbinger H, Wessler I (2003) Proliferative effect of acetylcholine on rat trachea epithelial cells is mediated by nicotinic receptors and muscarinic receptors of the M1-subtype. *Life Sci* 72:2075-2080

Miyata T, Matsumoto N, Yuki H, Oda Y, Takahama K, Kai H (1989) Effects of anticholinergic bronchodilators on mucociliary transport and airway secretion. *Japan J Pharmacol* 51:11-15

Morris D (1965) The choline acetyltransferase of human placenta. *Biochem J* 98:754-762

Mullol J, Baraniuk JN, Logun C, Merida M, Hausfeld J, Shelhamer JH, Kaliner MA (1992) M1 and M3 muscarinic antagonists inhibit human nasal glandular secretion in vitro. *J Appl Physiol* 73:2069-2073

Nguyen VT, Ndoeye A, Grando SA (2000) Novel human $\alpha 9$ acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol* 157:1377-1391

Nguyen VT, Ndoeye A, Hall LL, Zia S, Arredondo J, Chernyavsky AI, Kist DA, Zelickson BD, Lawry MA, Grando SA (2001) Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine. *J Cell Sci* 114:1189-1204

Oliveira MJR, Pereira AS, Guimarães L, Grande NR, Moreira de Sá C, Águas AP (2003) Zonation of ciliated cells on the epithelium of the rat trachea. *Lung* 181:275-282

Pack RJ, Al-Ugaily LH, Morris G (1981) The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscope study. *J Anat* 132:71-84

Pack RJ, Al-Ugaily LH, Morris G, Widdicombe JG (1980) The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse. *Cell Tissue Res* 208:65-84

Pack RJ, Al-Ugaily LH, Widdicombe JG (1984) The innervation of the trachea and extrapulmonary bronchi of the mouse. *Cell Tissue Res* 238:61-68

Pavelka M, Ronge HR, Stockinger G (1976) Vergleichende Untersuchung am Trachealepithel verschiedener Säuger. *Acta anat* 94:262-282

Piavaux B, Jeurink PV, Groot PC, Hofman GA, Demant P, Van Oosterhout AJ (2007) Mouse genetic model for antigen-induced airway manifestations of asthma. *Genes Immun* 8:28-34

Proskocil BJ, Sekhon HSS, Jia Y, Savchenko V, Blakely RD, Lindstrom J, Spindel ER (2004) Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone

synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells. *Endocrinology* 145:2498-2506

Quigley RL, Shafer SH, Williams CL (1998) Regulation of integrin-mediated adhesion by muscarinic acetylcholine receptors and protein kinase C in small cell lung carcinoma. *Chest* 114:839-846

Ramnarine SI, Haddad EB, Khawaja AM, Mak JC, Rogers DF (1996) On muscarinic control of neurogenic mucus secretion in ferret trachea. *J Physiol* 494:577-586

Reinheimer T, Baumgärtner D, Höhle KD, Racké K, Wessler I (1997) Acetylcholine via muscarinic receptors inhibits histamine release from human isolated bronchi. *Am J Respir Crit Care Med* 156:389-395

Reinheimer T, Bernedo P, Klapproth H, Oelert H, Zeiske B, Racke K, Wessler I (1996) Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea pig, and human: species differences in role of airway mucosa. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 270:722-728

Reinheimer T, Munch M, Bittinger F, Racke K, Kirkpatrick CJ, Wessler I (1998a) Glucocorticoids mediate reduction of epithelial acetylcholine content in the airways of rats and humans. *Eur J Pharmacol* 22:277-284

Reinheimer T, Vogel P, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Saloga J, Knop J, Wessler I (1998b) Up-regulation of non-neuronal acetylcholine in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 110:556

Rhodin JA (1966) The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa. *Am Rev Respir Dis* 93:1-15

Rimmaudo LE, de la Torre E, Sacerdote de Lustig E, Sales ME (2005) Muscarinic receptors are involved in LMM3 tumor cells proliferation and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 334:1359-1364

Rogers DF (2000) Motor control of airway goblet cells and glands. *Respir Physiol* 125:129-144

Rogers DF (2005) Mucociliary dysfunction in COPD: effect of current pharmacotherapeutic options. *Pulm Pharmacol Ther* 18:1-8

Rott HD (1979) Kartagener's syndrome and the syndrome of immotile cilia. *Hum Genet* 46:249-261

Sadé J, Eliezer N, Silberberg A, Nevo AC (1970) The role of mucus in transport by cilia. *Am Rev Respir Dis* 102:48-52

Salathe M, Bookman RJ (1999) Mode of Ca^{2+} action on ciliary beat frequency in single ovine airway epithelial cells. *J Physiol* 3:851-865

Salathe M, Lipson EJ, Ivonnet PI, Bookman RJ (1997) Muscarinic signaling in ciliated tracheal epithelial cells: dual effects on Ca^{2+} and ciliary beating. *Am J Physiol* 272:301-310

Sanderson MJ, Dirksen ER (1985) A versatile and quantitative computer-assisted photoelectronic technique used for the analysis of ciliary beat cycles. *Cell Motil* 5:267-292

Sastry BV, Sadavongvivad C (1978) Cholinergic systems in non-nervous tissues. *Pharmacol Rev* 30:65-132

Satir P, Matsuoka T (1989) Splitting the ciliary axoneme: implications for a „switch-point“ model of dynein arm activity in ciliary motion. *Cell Motil Cytoskeleton* 14:345-358

Schneeberger EE, Lynch RD (1997) Chapter: Airway and alveolar epithelial cell junctions, in: The Lung, Raven, Philadelphia, 1:505-515

Seybold ZV, Abraham WM, Gazeroglu H, Wanner A (1992) Impairment of airway mucociliary transport by *Pseudomonas aeruginosa* products. Role of oxygen radicals. Am Rev Respir Dis 146:1173-1176

Shafer SH, Puhl HL, Phelps SH, Williams CL (1999) Activation of transected M1 or M3 muscarinic acetylcholine receptors induces cell-cell adhesion of chinese hamster ovary cells expressing endogenous cadherins. Exp Cell Res 248:148-159

Sleigh MA (1982) Movement and coordination of tracheal cilia and the relation of these to mucus transport. Prog Clin Biol Res 80:19-24

Sleigh MA (1983) Ciliary function in transport of mucus. Eur J Respir Dis Suppl 128:287-292

Sleigh MA (1984) The integrated activity of cilia: function and coordination. J Protozool 31:16-21

Sleigh MA, Blake JR, Liron N (1988) The propulsion of mucus by cilia. Am Rev Respir Dis 137:726-741

Song P, Sekhon HS, Proskocil B, Blusztajn JK, Mark GP, Spindel ER (2003) Synthesis of acetylcholine by lung cancer. Life Sci 72:2159-2168

Starke K (1996) Kapitel: Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems, in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Spektrum, Heidelberg, S.112-115

Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 63:101-132

Struckmann N, Schwering S, Wiegand S, Gschnell A, Yamada M, Kummer W, Wess J, Haberberger RV (2003) Role of muscarinic receptor subtypes in the constriction of peripheral airways: Studies on receptor-deficient mice. *Mol Pharmacol* 64:1444-1451

Taira K, Shibasaki S (1978) A fine structure study of the non-ciliated cells in the mouse tracheal epithelium with special reference to the relation of "brush cells" and "endocrine cells". *Arch Histol Jap* 41:351-366

Tamaoki J, Chiyotani A, Tagaya E, Sakai N, Konno K (1994) Effect of long term treatment with oxitropium bromide on airway secretion in chronic bronchitis and diffuse panbronchiolitis. *Thorax* 49:545-548

Tobin G, Giglio D, Gotrick B (2002) Studies of muscarinic receptor subtypes in salivary gland function in anaesthetized rats. *Auton Neurosci* 100:1-9

Usdin TB, Eiden LE, Bonner TI, Erickson JD (1995) Molecular biology of the vesicular ACh transporter. *Trends Neurosci* 18:218-224

Velasquez DJ, Morrow PE (1984) Estimation of guinea pig tracheobronchial transport rates using a compartmental model. *Exp Lung Res* 7:163-176

Walch L, Norel X, Leconte B, Gascard JP, Brink C (1999) Cholinergic control of human and animal pulmonary vascular tone. *Therapie* 54:99-102

Wanner A, Salathé M, O'Riordan TG (1996) Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1868-1902

Wess J (2004) Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:423-450

Wessler IK, Kirkpatrick CJ (2001a) The non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther* 14:423-434

Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K (1998) Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: Expression and function in humans. *Pharmacol Ther* 77:59-79

Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Kirkpatrick CJ (2001b) The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. *Jpn J Pharmacol* 85:2-10

Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ (2003) The non-neuronal cholinergic system in humans: Expression, function and pathophysiology. *Life Sci* 72:2055-2061

Whittaker VP (1963) Eichler O, Farah A, Koelle GB (eds) Identification of acetylcholine and related esters of biological origin, in: *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 15:1-39

Williams CL (2003) Muscarinic signaling in carcinoma cells. *Life Sci* 72:2173-2182

Winters SL, Davis CW, Boucher RC (2007) Mechanosensitivity of mouse tracheal ciliary beat frequency: roles for Ca^{2+} , purinergic signalling, tonicity and viscosity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:614-624

Wong LB, Miller IF, Yeates DB (1988a) Regulation of ciliary beat frequency by autonomic mechanism: in vitro. *J Appl Physiol* 65:1895-1901

Wong LB, Miller IF, Yeates DB (1988b) Stimulation of ciliary beat frequency by autonomic agonists: in vivo. *J Appl Physiol* 65:971-981

- Wong LB, Miller IF, Yeates DB (1993) Nature of the mammalian ciliary metachronal wave. *J Appl Physiol* 75:458-467
- Yang B, McCaffrey TV (1996) The roles of muscarinic receptor subtypes in modulation of nasal ciliary action. *Rhinology* 34:136-139
- Yang ZJ, Biggs DF (1991) Muscarinic receptors and parasympathetic neurotransmission in guinea-pig trachea. *Eur J Pharmacol* 193:301-308
- Yoda M (1976) Electron microscope study on the tracheal epithelium of rats with special references to the non-ciliated cells (Japanese text with english abstract). *Kitakanto Igaku* 26:29-56
- Zagoory O, Braiman A, Gheber L, Priel Z (2001) Role of calcium and calmodulin in ciliary stimulation induced by acetylcholine. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:100-109
- Zarghooni S, Wunsch J, Bodenbenner M, Brüggmann D, Grando SA, Schwantes U, Wess J, Kummer W, Lips KS (2007) Expression of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the mouse urothelium. *Life Sci* 80:2308-2313
- Zhang L, Han DM, Wang H, Zhou B, Sanderson MJ (2004) Measurement of respiratory ciliary beat frequency quantified with high-speed digital microscopy. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 39:433-437

9 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

10 Anhang

10.1 Eigene Veröffentlichungen zum Thema

10.1.1 Originalarbeit

Klein MK, Haberberger RV, Hartmann P, Lips KS, Krain B, Wess J, Kummer W, König P (eingereicht 2008)

Muscarinic receptor subtypes in cilia-driven transport and airway epithelial development.

10.1.2 Abstract

Klein MK, Haberberger RV, Wess J, Kummer W, König P (2006)

Tracheal particle transport and epithelial differentiation in muscarinic receptor gene-deficient mice.

Eur Resp J 28 (Suppl 50):564s

European Respiratory Society, Annual Congress 2006, Munich, Germany, 2006

10.2 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre nicht zustande gekommen, wenn ich nicht breite Unterstützung und Hilfe gehabt hätte.

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Kummer für die Überlassung des Themas, des Arbeitsplatzes, für seine jederzeit gewährte Hilfsbereitschaft, sowie sein unermüdliches Engagement bei allen Fragestellungen und während der gesamten Zeit der Zusammenarbeit

Für die Übernahme der Begutachtung aus dem Fachbereich Veterinärmedizin danke ich Herrn Prof. Dr. M. Bergmann.

Peter König danke ich sehr für seine große Hilfe, die Lösung etlicher kleiner und großer Probleme und für seine umfangreiche Betreuung weit über die Abfassung der Dissertation hinaus.

Der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Durchführung dieser Arbeit

Für eine unvergesslich gute, lustige, teilweise auch skurile Zeit im Institut („gib mir Namen“) danke ich sehr Petra F, Silke W, Petra H, Martin B, Gabi K, Katrin L, Tamara P und alle anderen „Kaffeerundenteilnehmern“.

Karola Michael danke ich für eine große Unterstützung bei der graphischen Ausarbeitung vor allem bei der Bearbeitung der tausend EM-Bilder.

Patricia Berger danke ich für ihre immer freundliche Hilfe, viele Ratschläge und die Suche nach „versteckter“ Literatur.

Meinem Freund Matthias, der immer an mich geglaubt hat, danke ich sehr für seine Begleitung als Partner, bester Freund und Seelentröster.

Meiner liebe Nico danke ich für die beste Freundschaft und die damit verbundene Pflege und Regeneration meines seelischen Wohls.

Danken möchte ich meinen Eltern, die durch ihre Liebe und Unterstützung erst alles möglich gemacht haben.

Zuletzt sei noch allen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung (man möge mir verzeihen) fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 383595273-0



9 17838351952737